

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE ODPADNÍCH RÝŽOVÝCH SUBSTRÁTŮ A
MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ MIKROORGANISMY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JIŘÍ KAPAR

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE ODPADNÍCH RÝŽOVÝCH SUBSTRÁTŮ A MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ MIKROORGANISMY

CHARACTERIZATION OF WASTE RICE SUBSTRATES AND THEIR POTENTIAL UTILIZATION BY
MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JIŘÍ KAPAR

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0598/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Jiří Kapar	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Charakterizace odpadních rýžových substrátů a možnosti jejich využití mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled odpadů z potravinářství a zemědělství se zvláštním zaměřením na cereální a rýžové substráty a jejich využití v biotechnologických procesech
2. Optimalizace metod pro analýzu a charakterizaci polysacharidů a jejich složek.
3. Hydrolýza komplexních rýžových a cereálních sacharidů a využití degradačních produktů vybranými mikroorganismy

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jiří Kapar
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo charakterizovat vybrané cereální substráty a na základě výsledků skupinových parametrů určit nejvhodnější substrát pro využití modelovými průmyslovými mikroorganismy.

Analýza celkových polyfenolů, redukujících sacharidů a celkových sacharidů byla provedena spektrofotometricky. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí byl změřen obsah jednotlivých mono- a disacharidů. Sacharidy byly z cereálních substrátů extrahovány vodou a poté podrobeny kyselé hydrolyze.

Dva druhy rýžových substrátů byly dále vybrány jako nutriční zdroje pro kultivaci dvou modelových průmyslových mikroorganismů: kvasinky *Rhodotorula glutinis* a bakterie *Bacillus subtilis*. Substráty byly před přidavkem do produkčního média upraveny chemickou nebo enzymovou hydrolyzou a analyzovány. U mikroorganismů byla sledována produkce biomasy na různě upraveném typu odpadního substrátu.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to characterize some cereal substrates. Based on the results of group parameters the most suitable substrate for cultivation of model industrial microorganisms was proposed.

Analysis of total phenolics, reducing sugars and total sugars was performed spectrophotometrically. Using high-performance liquid chromatography with refractometry index detection content of individual mono-and disaccharides was measured. Saccharides were extracted from cereal substrates by water and then acid hydrolysis was applied.

Two rice substrates were then used as nutrition sources for cultivation of two model industrial microorganisms: yeast *Rhodotorula glutinis* and bacterium *Bacillus subtilis*. Before use to production media substrates were processed by chemical and enzyme hydrolysis and analyzed. Production of microbial biomass in media with modified waste substrates was evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

Odpadní substráty, rýže, sacharidy, *Rhodotorula glutinis*, *Bacillus subtilis*

KEYWORDS

Waste substrates, rice, sugars, *Rhodotorula glutinis*, *Bacillus subtilis*

KAPAR, J. *Charakterizace odpadních rýžových substrátů a možnosti jejich využití mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 68 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citoval správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Rád bych poděkoval paní doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotu, laskavost, odborné a cenné rady, které mi usnadnily vypracování této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval doktorandce Ing. Andree Lichnové za pomoc při měření experimentální části práce.

Předložená práce byla finančně podpořena z prostředků projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Zákon o odpadech.....	9
2.2	Odpady ze zemědělské činnosti	9
2.2.1	Odpady rostlinného původu	9
2.2.1.1	Sláma	9
2.2.1.2	Bramborová nat'	9
2.2.1.3	Řepný chrást	9
2.2.1.4	Silážní šťávy	9
2.2.2	Odpady živočišného původu	10
2.2.2.1	Chlévská mrva	10
2.2.2.2	Močůvka	10
2.2.2.3	Hnojívka.....	10
2.2.2.4	Kejda.....	10
2.3	Odpady potravinářského průmyslu	10
2.3.1	Odpady z mlynářského průmyslu	11
2.3.2	Odpady ze sladovnického průmyslu	11
2.3.3	Odpady z pivovarského průmyslu	11
2.3.4	Odpady ze škrobářského průmyslu	11
2.3.5	Odpady z lihovarnického průmyslu	12
2.3.6	Odpady z cukrovarnického průmyslu	12
2.3.7	Odpady z tukového a olejářského průmyslu	12
2.3.8	Odpady z konzervářského průmyslu	12
2.3.9	Odpady z vinařského průmyslu	13
2.3.10	Odpady z droždářského a kvasného průmyslu	13
2.3.11	Odpady z mlékářského průmyslu	13
2.3.12	Odpady z masného průmyslu.....	13
2.4	Sacharidy – obecná část	14
2.5	Monosacharidy	14
2.5.1	Glukosa.....	14
2.5.2	Fruktosa	15
2.5.3	Mannosa a galaktosa.....	15
2.6	Oligosacharidy	15
2.6.1	Sacharosa.....	16
2.6.2	Maltosa	16
2.6.3	Laktosa	17
2.7	Polysacharidy	17
2.7.1	Škrob	17
2.7.2	Neškrobové polysacharidy	18
2.8	Obilní suroviny (cereálie).....	19

2.8.1	Morfologická stavba zrna	19
2.8.2	Chemické složení obilovin	20
2.8.3	Sacharidy obilovin	20
2.8.4	Monosacharidy a oligosacharidy obilovin	20
2.8.5	Polysacharidy obilovin	20
2.9	Rýže	21
2.10	Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulosity pro výrobu bioethanolu	22
2.10.1	Charakteristika lignocelulosových materiálů	22
2.10.2	Enzymová hydrolýza lignocelulosových materiálů	23
2.10.3	Fermentační výroba bioethanolu	23
2.11	Výroba a využití bioplynu	23
2.11.1	Možnosti využití bioplynu	23
2.11.2	Zdroje pro výrobu bioplynu	24
2.12	Mikroorganismy rodů <i>Rhodotorula</i> a <i>Bacillus</i>	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie, přístroje, materiál	26
4.1.1	Použité chemikálie	26
4.1.2	Použité přístroje	26
4.1.3	Použitý materiál	27
4.1.4	Použité mikroorganismy a enzymy	27
4.2	Stanovení celkových polyfenolů	28
4.3	Stanovení celkových flavonoidů	28
4.4	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	28
4.5	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona	29
4.6	Analýza sacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze	29
4.7	Analýza mono- a disacharidů ve vzorcích pomocí metody HPLC	30
4.8	Analýza sacharidů ve vzorcích po enzymové hydrolýze	30
4.9	Kultivace mikroorganismů	30
4.9.1	Inokulum I	30
4.9.2	Inokulum II	31
4.9.3	Produkční média	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1	Stanovení celkových polyfenolů	33
5.2	Stanovení celkových flavonoidů	34
5.3	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	36
5.4	Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona	38

5.5	Analýza redukujících sacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze	41
5.6	Analýza sacharidů pomocí metody TLC	44
5.7	Analýza mono- a disacharidů ve vzorcích pomocí metody HPLC	45
5.8	Charakterizace změn produkčních médií s rýžovým substrátem u kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i>	47
5.8.1	Pozorování morfologických změn u kvasinek pod mikroskopem	48
5.8.2	Pozorování zabarvení u produkčních médií	49
5.8.3	Analýza redukujících sacharidů v produkčních médiích	50
5.8.4	Stanovení biomasy <i>R. glutinis</i> v produkčních médiích.....	52
5.9	Charakterizace produkčních médií u bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	54
5.9.1	Analýza redukujících sacharidů v produkčních médiích <i>B.subtilis</i>	54
5.9.2	Stanovení biomasy Bakterie <i>B.subtilis</i> v produkčních médiích.....	56
6	ZÁVĚR.....	58
7	POUŽITÁ LITERATURA	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
9	SEZNAM PŘÍLOH	65
10	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

V dnešní době dochází k nárůstu odpadů ze zemědělských a potravinářských výrob. Ve srovnání s jinými odvětvími hospodářství zpracovává ekonomicky náročné suroviny, proto je komplexní zpracování zemědělských produktů s minimalizací tvorby odpadů a s jejich maximálním využitím nutností. Význam takového přístupu se bude v budoucnu ještě zvyšovat v souvislosti s celosvětovým problémem zajištění výživy narůstající světové populace. Drtivá většina surovin pro potravinářský průmysl je získávána z obnovitelných zdrojů – produkcí biomasy rostlinného i živočišného původu [1].

Odpady ze zemědělské činnosti a potravinářské výroby jsou velkým zdrojem organických látek (celulosa, hemicelulosa, lignin, bílkoviny, aminokyseliny, sacharidy), minerálních látek a energie. Tyto odpady díky vysokému podílu organických látek jsou vhodné k biochemickému zpracování. Jejich dalším využitím může být zkrmování hospodářskými zvířaty, zpracováním na aditiva apod. Tyto odpady mají široké využití jako substráty pro mikrobiální růst, čímž získáváme další užitečné produkty a enzymy [2].

Mezi nejvýznamnější enzymy sloužící k rozkladu odpadů potravinářských výrob slouží celulytické, ligninolytické a pektolytické enzymy, které jsou produkovány pomocí mikroorganismů jako je *Bacillus subtilis*, *Mucor flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*, *Clostridium cellulolyticum* a další [3].

Mezi velmi důležité mikroorganismy se dnes řadí kvasinky produkující karotenoidy, jako je například *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a další. Tyto kvasinky mohou být využity ke kultivaci na odpadech z různých zemědělských výrob. Karotenoidy jsou velmi účinnými antioxidanty. Díky svým vlastnostem našly uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Zákon o odpadech

Zákon o odpadech v plném znění představuje zákon č.185/2001 Sb., o odpadech a změně některých dalších zákonů. Tento zákon stanovuje pravidla pro předcházení vzniku odpadů a pro nakládání s nimi [4].

2.2 Odpady ze zemědělské činnosti

2.2.1 Odpady rostlinného původu

Mezi odpady z rostlinné výroby patří *sláma*, *bramborová nat'*, *řepný chrást*, *zeleninová nat'*, *silážní šťávy*, znehodnocená krmiva (zelená píce, seno, siláže, senáže), listí ovocných dřevin, klest prořezávek ovocných sadů, nadzemní hmota plodin na semeno po chemickém ošetření (jeteloviny, luskoviny, olejniny). Ve většině případů jsou velkým zdrojem organických látek a minerálních živin. Mezi nejčastější způsoby jejich využití patří zkrmování hospodářskými zvířaty, silážování, přímé hnojení zemědělských plodin a kompostování [2].

2.2.1.1 Sláma

Roční produkce *slámy* jako odpadu dosahuje v České republice přibližně 7,5 mil. tun. Přitom převažuje sláma obilnin (6,5 mil. tun). Zbytek tvoří sláma řepky, luskovin a víceletých pícnin na semeno [2].

2.2.1.2 Bramborová nat'

Vzniká jako odpad po dozrání bramborových hlíz před jejich sklizní. Produkce natě závisí na odrůdě a termínu sklizně a pohybuje se v rozmezí 5 až 15 tun na hektar. Složení natě je rovněž závislé na době sklizně. Nat' se sklízí ještě čerstvá, má vyšší obsah živin než znehodnocená chemickým ošetřením neboli desikací [2].

2.2.1.3 Řepný chrást

Vzniká jako vedlejší produkt při sklizni řepných bulev, může se jednat o cukrovku, polocukrovku nebo krmnou řepu. Vyprodukované množství chrástu kolísá v závislosti na termínu sklizně, způsobu sklizně a výšce seřezu hlavy bulev, který se pohybuje od 70 do 110 % hmotnosti bulev, což v průměru představuje 30 tun na hektar [2].

2.2.1.4 Silážní šťávy

Silážní šťávy jsou velmi agresivní a potenciálně toxický zemědělský odpad. Jejich závadnost spočívá především ve vyšší koncentraci kvasných organických kyselin a dalších organických látek, při jejichž biologickém rozkladu se spotřebovává kyslík obsažený ve vodě a dostanou-li se do vodních toků a nádrží, dochází k odumírání rostlin a živočichů [2].

2.2.2 Odpady živočišného původu

K nejdůležitějším odpadům živočišného původu z živočišné výroby patří *chlévká mrva*, *močůvka*, *kejda* a *hnojůvka*. V místě jejich vzniku se však o odpad nejedná. Jejich význam spočívá v tom, že obsahují cenné organické látky (celulosu, hemicelulosu, lignin, sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, auxiny apod.), minerální živiny (N, P, K, Ca, Mg, mikroelementy), mikroorganismy a růstové faktory. Jsou tak zdrojem látek pro tvorbu půdního humusu a zvyšování zásoby živin v půdě [2].

2.2.2.1 Chlévká mrva

Jedná se o čerstvou směs podestýlky, tuhých a tekutých výkalů hospodářských zvířat, která se po správné fermentaci (zrání) stává chlévkým hnojem – cenným hnojivem [2].

2.2.2.2 Močůvka

Močůvka je zkvašená moč hospodářských zvířat ředěná vodou. Obsahuje malé množství organických látek, ale relativně vyšší množství dusíku a draslíku a je proto považována při dodržování všech aplikačních zásad za hodnotné dusíkato-draselné hnojivo [2].

2.2.2.3 Hnojůvka

Hnojůvka je tekutina, která vytéká na hnojišti z uloženého hnoje v důsledku snížení její retenční kapacity pro vodu po mineralizaci části organické hmoty. Hlavní rozdíl mezi hnojůvkou a močůvkou spočívá v tom, že močůvka obsahuje jen malé množství mikrobů, zatímco hnojůvka je na mikroby bohatá [2].

2.2.2.4 Kejda

Kejda je částečně zkvašená směs tuhých a tekutých výkalů hospodářských zvířat ředěná vodou. Produkována je v bezstelivových provozech při ustájení na rostech. Tuhé a tekuté výkaly propadávají rostem do sběrných kanálů nebo jsou zvířaty přes rošty prošlapávány a vodou jsou splachovány do jímek. Podle původu se rozlišuje kejda skotu, prasat a drůbeže [2].

2.3 Odpady potravinářského průmyslu

V potravinářském průmyslu nevznikají nebezpečné odpady. Téměř všechny dnešní odpady lze přepracovat s větší či menší účinností na zemědělsky či jinak využitelné druhotné suroviny. Zpracování potravinářských odpadů je velmi důležité, protože jde převážně o organický odpad, který tvoří cennou druhotnou surovinu vhodnou především na biochemické zpracování. Důležitými odvětvími potravinářského průmyslu je výroba cukru, zpracování mléka a výroba mléčných výrobků, výroba chleba a pečiva, výroba sladu a piva, masná výroba, výroba nápojů, jedlých olejů a tuků, výroba droždí a škrobu, výroba čokolády a cukrovinek, zpracování ovoce a zeleniny, výroba alkoholických a nealkoholických nápojů. Ve všech těchto provozech se produkuje velké množství odpadů, které je možno zpracovat a využít. Tyto odpadové látky jsou většinou biologicky rozložitelné a netoxické. Jejich likvidace je jednodušší než likvidace odpadů z chemického průmyslu. Odpady z potravinářského průmyslu můžeme využít takto: zpracováním na krmiva, zpracováním na aditiva

do potravin, zpracováním na různé průmyslové výrobky (peří, kůže, rohovina atd.), jako substráty (živiny) na kultivaci mikroorganismů – fermentační cestou se takto získají např. organické kyseliny, droždí, ethylalkohol, aminokyseliny (z melasy), polysacharidy (ze syrovátky) apod. Z některých vnitřností hospodářských zvířat se vyrábějí hormony, dále jsou vnitřnosti využitelné ke kompostování a na výrobu hnojiv. Pro potravinářský průmysl je typické, že určitý podíl surovin se stává odpadem již před použitím v technologických procesech, zejména z důvodu nesplnění hygienických požadavků na zpracovávanou surovinu. Jedná se zejména právě o rostlinné a živočišné produkty s vysokým obsahem těžkých kovů, reziduí pesticidů, mykotoxinů, choroboplodných zárodků, parazitů apod. [2, 5, 6].

2.3.1 Odpady z mlynářského průmyslu

Krmné mouky vznikají při mletí obilného zrna, hlavně pšeničného a žitného a jedná se o tzv. zadní mouky, to jsou mouky nejhorší kvality, které se vyznačují tmavým zbarvením. Obsahují značné množství organických a minerálních látek. *Otruby* jsou zbytky při mlýnském zpracování pšenice a žita, obsahující převážně obalové části zrna. *Čistírenské klíčky* se získávají při loupání a kartáčování zrna. Cílem těchto operací je odstranit oplodí, obalové vrstvy zrna, klíčky a vousky, aby se zvýšila trvanlivost mouky. Čistírenské klíčky obsahují vitamíny B a E, tuky, enzymy a popeloviny. *Mlýnské klíčky* se získávají při luštění krupic na mlecích válcích. Tvarem se podobají vločkám a obsahují až 40 % otrub. Obsah hrubého proteinu v sušině dosahuje až 25 % [2].

2.3.2 Odpady ze sladovnického průmyslu

K odpadům ze sladovnického průmyslu patří *výčist*, což jsou zbytky vznikající při třídění ječmene, dále sem patří *splávky*, které vyplouvají na povrch při máčení ječmene, *sladový květ* a *odpadní máčecí vody* [2].

2.3.3 Odpady z pivovarského průmyslu

Odpady pivovarského průmyslu představuje *pivovarské mláto*, které tvoří nerozpustné složky sladu a dále látky, které při rmutování koagulovaly a zachytily se ve vrstvě mláta. *Pivovarské kvasnice* jsou odpadní kvasnice, které se již nedají použít jako zákvas. Dalšími odpady jsou *hořké kaly*, které vznikají při sedimentaci a filtraci mladiny a v neposlední řadě *odpadní vody* [2].

2.3.4 Odpady ze škrobárenského průmyslu

Při výrobě škrobu z brambor vzniká jako hlavní odpad vláknina, která se lisuje nebo suší a poté se používá ke zkrmování pro hovězí dobytek. Vedlejším produktem výroby pšeničného škrobu je lepek. Suchý jedlý lepek se používá jako rostlinná aditivní bílkovina do různých výrobků a jako surovina pro výrobu polévkového koření. Technický lepek nachází uplatnění v obuvnickém průmyslu. Z výroby kukuřičného škrobu odpadá bílkovina gluten [1].

2.3.5 Odpady z lihovarnického průmyslu

Odpad zvaný jako *výpalky* je zbytek tzv. zápary (ztekucený a zcukřený škrob, následně prokvašený), který je zbavený lihu oddestilováním. *Lihovarská šáma* představuje vápenato-hořečnaté kaly vznikající při produkci výpalků. Jako téměř v každém průmyslu, i zde jsou *odpadní vody* [2].

2.3.6 Odpady z cukrovarnického průmyslu

Nejvýznamnějším odpadním produktem výroby cukru je *melasa* obsahující asi 50 % sacharosy, 18 - 21 % různých organických látek, 9 - 12 % popela a 20 % vody. Melasa je základní surovinou pro fermentační procesy, využívá se zejména pro výrobu lihu a droždí, lze ji využít jako substrát při jiných fermentačních výrobcích, např. kyseliny citronové, šťavelové, máselné a mléčné, dále při výrobě glycerolu, butanolu, acetonu, technického dextranu a dalších produktů, které se mohou připravovat fermentačními postupy. Melasa je také využívána jako substrát při produkci biomasy. Dalším významným vedlejším produktem výroby cukru jsou *vyslazené řízky*. Vyslazené řízky jsou velmi hodnotným krmivem. Z propraných řízků se vyrábí dietní vláknina. Dalším zužitkovávaným vedlejším produktem je *saturační kal* získávaný po čerání a saturaci difúzní šťávy. Saturační kal obsahuje vysoké množství uhličitane vápenatého, menší množství organických látek, dusíku, kyseliny fosforečné a sacharosy [1].

2.3.7 Odpady z tukového a olejářského průmyslu

Pokrutiny vznikají ve formě koláčů při lisování semene na hydraulických lisech. Pokrutiny obsahují 90-92 % sušiny, z toho 35 - 40 % dusíkatých látek, 30 - 35 % bílkovin, 5 - 10 % tuku, 8 - 12 % vlákniny. *Pokrutinové šroty* vznikají po extrakci semen nebo předlisované olejnaté suroviny a následném drcení a mletí vytvořených pokrutin. Některé šroty se mohou využívat např. k výrobě kaseinu nebo aminokyselin. *Slupky* jsou odpadem při loupaní olejnatých rostlin. Pro vysokou energetickou hodnotu se využívají jako topivo nebo na výrobu furfuralu. *Olejnate kaly* se tvoří jako usazeniny v zásobních nádržích na olej po vylisování semen a nebo při rafinaci oleje. Jejich podstatou jsou lecitiny, které patří do skupiny fosfolipidů, obsahujících esterově vázanou kyselinu fosforečnou. Používají se k výrobě horších mýdel, v tukovém průmyslu jako emulgátory. Dalším odpadem tohoto průmyslu je *olejnatá drť semen* [1, 2].

2.3.8 Odpady z konzervářského průmyslu

Obalové listy a košťály košťálových zelenin představují největší objem odpadů při zpracování zeleniny. Obsahují zhruba 10 % sušiny, 2,3 % sacharidů, 1,5 % vlákniny. *Výlisky* jsou cenným vedlejším produktem, který vzniká při lisování ovoce na ovocné šťávy. Obsahují přibližně 24 % sušiny, 7 % vlákniny, 1,4 % tuku, 1,5 % dusíkatých látek. *Semena plodových zelenin* (rajčat, okurek) jsou velice hodnotným produktem stejně jako semena dýní a jádra z pecek peckového ovoce. Obsahují důležité minerální látky včetně stopových prvků. Další

odpady konzervářského průmyslu jsou *bramborové slupky*, *zeleninová nat'* a *odpadní vody* [2].

2.3.9 Odpady z vinařského průmyslu

Střapiny jsou zbytkem hroznů po odstranění bobulí. Je u nich zvýšený obsah celulosy. *Semena* obsahují kolem 20 % oleje, který lze získat extrakcí organickým rozpouštědly a díky dobrému zastoupení mastných kyselin se dají využívat v potravinářském průmyslu. *Výlisky* vznikají jako zbytek po vylisování moštu ze rmutu. Obsahují slupky bobulí, střapiny a semena. Je zde vyšší obsah tříslovin, hořkých látek a kyseliny vinné. *Kvasničné kaly* vznikají po vylisování sedimentovaných kalů a mrtvých kvasinek z prokvašeného moštu na kalolisech. Lze je zpracovat na destilát a nebo z nich vyrábět vinan draselný a kyselinu vinnou [2].

2.3.10 Odpady z droždářského a kvasného průmyslu

Odpadní mycelium je směs, která vzniká po extrakci kapalného podílu fermentace při výrobě kyseliny citrónové a mléčné, antibiotik, rozpouštědel a jiných látek v kvasném průmyslu. Směs se zahušťuje na 30 % sušiny. Obsahuje 65-80 % organických kyselin, 15-30 % dusíkatých látek, nevyužité cukry a minerální látky. *Odpadní droždí a droždářské kvasnicové mléko* vzniká jako vedlejší produkt při výrobě droždí. Tento odpad vyniká vyšším obsahem vitamínů skupiny B [2].

2.3.11 Odpady z mlékářského průmyslu

Syrovátku lze využít k výrobě laktosy, která má velké využití v potravinářském průmyslu. *Mlékárenské kaly* vznikají při výrobě různých mléčných produktů, nejvhodnější využití je společně s některými odpady z masného průmyslu [2].

2.3.12 Odpady z masného průmyslu

K odpadům masného průmyslu se řadí *krev*, dále *kosti*, které se dělí na výsekové (65 %) a technické (35 %). Výsekové kosti lze využít k potravinářským účelům, např. k přípravě polévek, technické kosti (kosti hlav, kosti končetin apod.) se zpracovávají různými technologickými procesy. Extrakcí a následným sušením technických kostí se získává kostní moučka, kostní tuk a tekutý kostní vývar. *Rohovina* zahrnuje rohy, kopyta a paznehty. Rohovinu lze zpracovat na různé hydrolyzáty, peptony, natrávené proteiny nebo šroty. *Odpady z jatek a kafilérií* patří mezi nejvýznamnější odpady. Dělí se na obligátní jatečné odpady, což jsou oční a ušní výkroje, hrtan, reprodukční orgány apod. a na kafilérní odpady. Zpracovávají se na masové nebo masokostní moučky. Dále za odpady v masném průmyslu považujeme *obsahy žaludků, bachorů a předžaludků, vývary z masné výroby a tukové odpady* [1, 2].

2.4 Sacharidy – obecná část

Názvem sacharidy se označují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které obsahují v molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy, a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetálových vazeb, tj. látky, ze kterých vznikají sacharidy hydrolýzou. K sacharidům se také řadí sloučeniny vzniklé ze sacharidů oxidačními, redukčními, substitučními a dalšími reakcemi. Podle počtu atomů uhlíku přítomných v molekule rozeznáváme *triosy*, *tetrosy*, *pentosy*, *hexosy* atd. Sloučeniny s aldehydovou funkční skupinou se nazývají *aldosy*, a sloučeniny s ketonovou skupinou se nazývají *ketosy* [7].

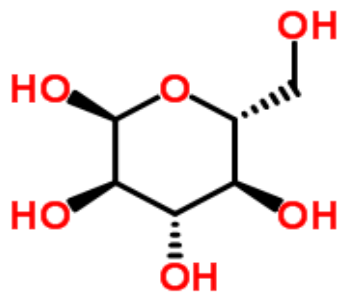
2.5 Monosacharidy

Monosacharidy, tedy aldosity i ketosy, se podle počtu uhlíků v řetězci dělí na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy atd. Uhlíkový řetězec monosacharidů přítomných v potravinách bývá obvykle lineární, existují však také monosacharidy s rozvětveným řetězcem. Monosacharidy se vyskytují jako látky s volnou karbonylovou skupinou (acyklické látky) a jako cyklické hemiacetaly též nazývané *poloacetaly* nebo *laktoly*. Triosy jsou výhradně acyklickými látkami, tetrosy a vyšší monosacharidy existují převážně v pětičlenných a šestičlenných, výjimečně v sedmičlenných cyklických strukturách. Monosacharidy jsou běžnými složkami téměř všech potravin, ale jejich obsah je značně proměnlivý, stejně tak jako zastoupení jednotlivých cukrů. Nejběžnějšími monosacharidy v potravinách jsou obecně hexosy a pentosy [7].

Podle postavení -H a -OH na asymetrickém uhlíku v sousedství skupiny -CH₂OH je řadíme podle konvence do řady D a L, přičemž přírodní sacharidy patří téměř ve všech případech do řady D [8].

2.5.1 Glukosa

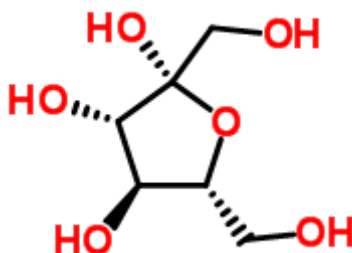
D-glukosa, nazývaná také hroznovým či škrobovým cukrem, bývá hlavním monosacharidem většiny potravin. D-glukosa je základní cukr v metabolismu a zdroj energie živočichů a rostlin. D-glukosa se nachází ve zralém ovoci, dále spolu s D-fruktosou v medu a v malém množství v krvi. D-glukosa je stavební jednotkou maltosy, laktosy a sacharosy a je monomerem mnoha polysacharidů např. škrobu, celulosy, glykogenu. Mnoho potravinářských procesů začíná hydrolýzou polysacharidů složených z glukosy a potom následují procesy založené na využití glukosy [7, 9].



Obr. 1 Strukturní vzorec *D*-glukosy [10]

2.5.2 Fruktosa

D-fruktosa je další důležitý cukr, který se bohatě vyskytuje v přírodě. Jako volný je obsažen v ovoci a v medu. D-fruktosa je sladší než sacharosa, dobře rozpustná ve vodě a v omezených dávkách je přijatelná pro diabetiky. D-fruktosa je stavební jednotkou mnoha oligo- a polysacharidů. D-fruktosa se vyrábí hydrolýzou fruktanů nebo se hydrolyzuje z hydrolyzátu sacharosy. D-fruktosu je možné vyrobit také enzymovou izomerací z D-glukosy, produkt se poté nazývá iso-glukosa [9].



Obr. 2 Strukturní vzorec *D*-fruktosy [11]

2.5.3 Mannosa a galaktosa

D-manosa je stavební jednotkou skupiny polysacharidů galaktomananů, ze kterých se získává hydrolýzou. Spolu s D-manosou se v těchto polysacharidech vyskytuje D-galaktosa, která je navíc součástí polysacharidů v mořských řasách. D-galaktosa se vyrábí z laktosy, která se skládá z D-galaktosy a D-glukosy [9].

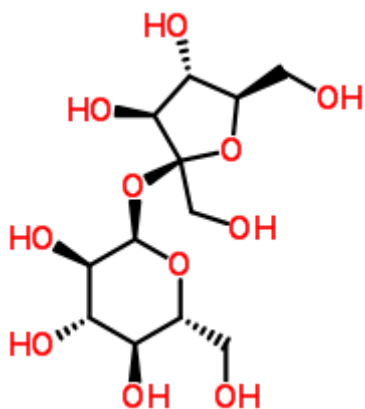
2.6 Oligosacharidy

Mezi oligosacharidy se řadí takové oligomery monosacharidů, u nichž jsou na sebe vázány dvě až deset molekul monosacharidů glykosidovou vazbou. Oligosacharidy jsou tedy glykosidy. Podle počtu jednotek se oligosacharidy dělí na di-, tri-, tetra-, penta- až dekasacharidy. Nejčastěji se v oligosacharidech vyskytují hexosy. Disacharid může teoreticky vznikat kondenzací α - nebo β -anomerní hydroxylové skupiny monosacharidu s libovolnou

hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Kondenzují-li vzájemně dvě poloacetalové hydroxylové skupiny, vzniklý disacharid neobsahuje volnou anomerní hydroxylovou skupinu, a je proto *neredukující*. V každém jiném případě vzniká redukující sacharid [7].

2.6.1 Sacharosa

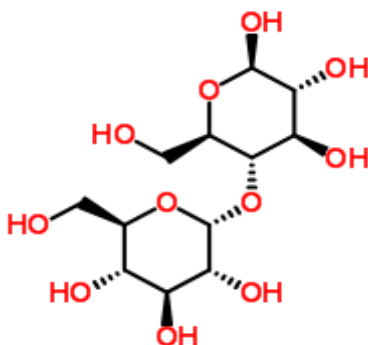
Sacharosa (β -D-fruktofuransol- α -D-glukopyranosid) se také označuje jako řepný nebo třtinový cukr a je nejvýznamnějším zástupcem neredukujících disacharidů. Sacharosa je cukrem velmi rozšířeným, syntetizuje ji většina eukaryotických organismů i některé prokaryotické mikroorganismy. Jako hlavní produkt fotosyntézy je běžně přítomna ve vyšších rostlinách, kde má především úlohu transportního a rezervního cukru. Hlavním průmyslovým zdrojem sacharosy je cukrová třtina a v našich podmínkách cukrová řepa. Sacharosa je po hydrolýze na glukosu a fruktosu (enzymem invertasou) resorbovatelná a využitelná jako zdroj energie. Kyselou nebo enzymovou hydrolýzou, tzv. *inverzí*, se ze sacharosy vyrábí směs D-glukosy a D-fruktosy zvaná inertní cukr [7].



Obr. 3 Strukturní vzorec sacharosy [12]

2.6.2 Maltosa

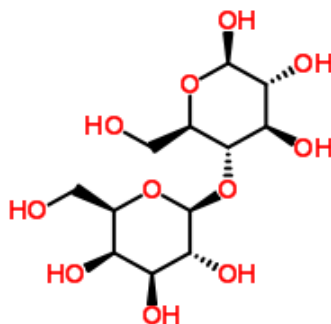
Maltosa (α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa) je redukující cukr, který je stavební jednotkou amylasy a nevětvených částí amylopektinu. Maltosa vzniká enzymovou hydrolýzou škrobu pomocí enzymu α -amylasy. Po hydrolýze na glukosu enzymem maltasou (α -D-glukosidglukohydrolasou) je využitelným cukrem [9].



Obr. 4 Strukturní vzorec maltosy [13]

2.6.3 Laktosa

Laktosa (*O*- β -galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa), je redukujícím disacharidem vyskytujícím se v mléce savců, a proto se nazývá také mléčný cukr. Laktosa je využitelná jako zdroj energie. Hydrolyzuje se na příslušné monosacharidy enzymem laktasou (β -galaktosidasou) v tenkém střevě. Laktasu produkují také bakterie mléčného kvašení, které štěpí laktosu na až na mléčnou kyselinu [7].



Obr. 5 Strukturní vzorec laktosy [14]

2.7 Polysacharidy

Polysacharidy neboli *glykany* se skládají z více než deseti monosacharidových jednotek a obsahují několik tisíc, stovek tisíc, až milion strukturních (stavebních) jednotek spojených vzájemně glykosidovými vazbami [7].

Polysacharidy, které obsahují ve své struktuře pouze jeden cukr, se nazývají *homopolysacharidy* (škrob, dextran, celuloza). Druhá skupina, která se skládá z více jak jednoho cukru, se nazývá *heteropolysacharidy*. Polysacharidy, které obsahují kyselé skupiny, karboxylové nebo sulfonové, se také mohou nazývat kyselé, druhá skupina jsou pak neutrální sacharidy [9].

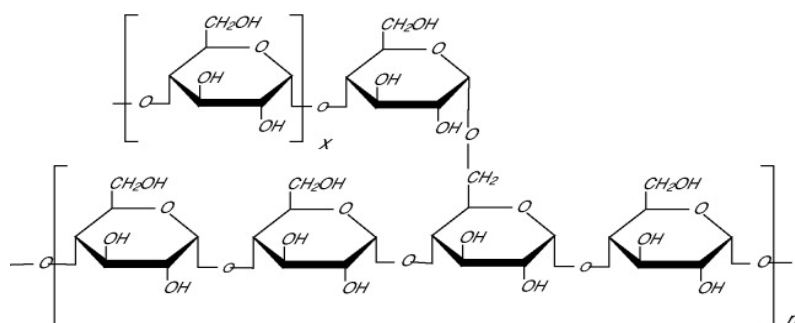
Za využitelné polysacharidy se považují rostlinné škroby (hlavní energetický zdroj) a živočišný glykogen. Mezi nevyužitelné polysacharidy se řadí celuloza, hemicelulosa a pektin, dále polysacharidy používané jako aditivní látky (polysacharidy mořských řas, mikrobiální polysacharidy, rostlinné gumy a slizy, modifikované polysacharidy) a lignin, z živočišných polysacharidů je to chitin. Souhrnně se tyto látky nazývají všeobecně rozšířeným termínem *vláknina* [7].

2.7.1 Škrob

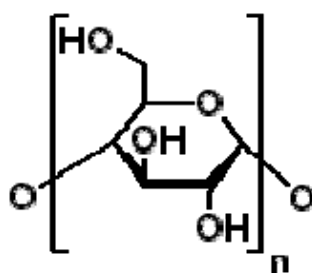
Škrob je hlavním zásobním polysacharidem rostlin, který slouží jako pohotová zásoba energie. Na rozdíl od strukturních polysacharidů, které jsou součástí buněčných stěn, se škrob nachází v organelách cytoplasmy nazývaných plastidy, kde také probíhá jeho biosyntéza [7].

Jako zásobní látka se nachází v semenech (obilí), v hlízách (brambory), v kořenech a nejrůznějších plodech. Celosvětově se škrob vyrábí nejvíce z kukuřice, pšenice, rýže a brambor. Škrob je glukan, který se skládá ze dvou makromolekul, z amylosy a amylopektinu. Amylosa je lineární α -D-(1 \rightarrow 4)-glukan a proto je polymerem disacharidu maltosy.

Molekula amylopektinu se skládá z řetězců D-glukosových jednotek vázaných α -(1 \rightarrow 4) vazbami, z nichž se po 10-100 jednotkách odvětvují vazbou α -(1 \rightarrow 6) postranní řetězce [9].



Obr. 6 Strukturní vzorec amylopektinu [15]



Obr. 7 Strukturní vzorec amylosy [16]

Tab. 1 Obsah škrobu a jeho složení ve významných zdrojích [7]

Potravina	Škrob (%)	Amylosa (%)
pšenice	59 – 72	24 – 29
žito	52 – 57	24 – 30
ječmen	52 – 62	38 – 44
oves	40 – 56	25 – 29
kukuřice	65 – 75	24 – 26
rýže	70 – 80	8 – 37
brambory	17 – 24	20 – 23

2.7.2 Neškrobové polysacharidy

Celulosa je podobně jako škrob vybudována z polymerů tvořených řetězcí glukosových jednotek, které jsou však spojeny vazbou β -(1 \rightarrow 4). Celulosa je v přírodě nejrozšířenější organickou sloučeninou. Vyskytuje se jako základní strukturní polysacharid buněčných stěn vyšších rostlin. Nachází se také v zelených řasách, houbách a výjimečně i ve stěnách buněk jednoduchých mořských bezobratlých živočichů. Celulosa tvoří v potravinách značný podíl neškrobových polysacharidů, a to tzv. nerozpustné vlákniny [7, 17].

Pentosany jsou definovány jako polymery obsahující v molekulách podstatný podíl pentos (nejvíce arabinosy a xylosy), vedle kterých však obsahují i jiné sloučeniny. Jde o pestrskou skupinu látek, které lze v zásadě rozdělit na pentosany nerozpustné ve vodě, tzv. hemicelulosity a pentosany rozpustné ve vodě, neboli slizy [17].

Polysacharidy nazývané β -glukany a také β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-D-glukany nebo β -glukany se smíšenými vazbami se nacházejí v zanedbatelném množství v buněčných stěnách dvouděložných rostlin, ale ve větším množství jsou přítomny v buněčných stěnách některých obilovin, kde tvoří až 30 % sušiny některých neškrobových polysacharidů [7].

Obsah neškrobových polysacharidů v pšenici a žitu je jen 0,2-2 % hmotnosti zrna a obsah v neloupaných zrnech rýže 1 - 2 % [7].

2.8 Obilní suroviny (cereálie)

Pro lidskou výživu se přímo (bez např. chemického zpracování) používá z obilovin výhradně zrna. Obiloviny (cereálie) patří botanicky mezi *traviny* – *Gramineae*. Téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi *lipnicovité*, *Poaceae*. Výjimku tvoří pohanka, patřící do čeledi *rdesnovité* - *Polygonaceae*. Společný botanický původ obilovin čeledi *lipnicovité* předurčuje jejich značnou vzájemnou podobnost jak ve struktuře a tvorbě zrna, tak v jeho chemickém složení, tj. např. v uspořádání obalových vrstev zrna nebo v zastoupení jednotlivých aminokyselin v obilné bílkovině nebo mastných kyselin v tukových složkách. Vlivem různých klimatických podmínek a během staletí šlechtění a pěstování se však současně vytvořily odlišnosti mezi jednotlivými botanickými rody a druhy obilovin i mezi jednotlivými odrůdami téhož druhu, např. ve složení a obsahu tzv. slizovitých látek, které silně vážou vodu, v obsahu tuku nebo v kvalitě bílkovin. Možnosti a výsledky šlechtění posledních desetiletí rozčlenily v mnoha případech i odrůdy stejné obiloviny pro určitá speciální použití. Další teoretickou možností ovlivnění specifických zpracovatelských vlastností dávají metody genového inženýrství [17].

2.8.1 Morfologická stavba zrna

Morfologická stavba zrna všech obilovin je zhruba stejná. Zrna se liší především tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Nejvrchnější vrstvy (oplodí) pokožky mají za úkol chránit zrna před mechanickým poškozením a krátkodobými účinky vody a škodlivých látek. Jsou proto tvořeny nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály, především celulosou. Další podpovrchové vrstvy (osemení) nesou v buňkách barviva a určují tak vnější barevný vzhled zrna. Dále některé další vrstvy obsahují polysacharidické látky, schopné do různé míry bobtnání a vázání vody, čímž do jisté míry přispívají k udržování rovnováhy vlhkosti zrna. Všechny tyto vrstvy tvoří pevnou houževnatou vrstvu, která při mletí zrna přechází do otrub. Na rozhraní mezi obalovými vrstvami a endospermem je měkká jednoduchá vrstva velkých buněk nazývaná aleuronová vrstva. Buňky aleuronové vrstvy obsahují vysoký podíl bílkoviny (cca 30 %), což je téměř trojnásobek obsahu v endospermu. Tyto buňky mají také nejvyšší obsah minerálních látek ze všech buněk zrna. Před mlýnským zpracováním je vždy předem odstraňován celý blok klíčku, který velmi rychle podléhá oxidačním a enzymovým změnám a podstatně by zhoršoval senzoryckou kvalitu výrobku. Pokud má být klíček zpracován pro další potravinářské použití, musí být inhibovány jeho enzymy během několika hodin [18].

2.8.2 Chemické složení obilovin

Chemické složení většiny obilovin se příliš neliší. Daleko větší variabilita je ve složení mezi odrůdami jednoho druhu obilí. Také půdní, klimatické a agrotechnické podmínky mají velmi výrazný vliv na chemické složení zrna a v některých případech i na vlastnosti jednotlivých složek [19].

Tab. 2 Průměrný obsah makroživin v cereáliích (ve 100 g sklizeného zrna) [20]

Cereálie	Proteiny (g)	Tuk (g)	Sacharidy (g)
Pšenice	12,6	2,7	72,4
Žito	11,0	2,4	82,0
Rýže (hnědá)	7,5	1,9	77,4
Kukuřice	9,0	3,9	72,2
Proso	10,0	2,9	72,9
Oves	15,0	7,0	69,0

2.8.3 Sacharidy obilovin

V obilném zrně lze nalézt pestrou paletu sacharidů od jednoduchých cukrů až po vysokomolekulární polysacharidy. Některé z nich jsou ovšem obsaženy v mikromnožství, zatímco jiné představují desítky procent z obsahu zrna. Obsahy sacharidů se v jednotlivých odrůdách mohou výrazně lišit a jsou ovlivňovány lokálními klimatickými a půdními podmínkami v daném roce a dodržováním agrotechnických opatření [18].

2.8.4 Monosacharidy a oligosacharidy obilovin

Monosacharidy jsou základními stavebními jednotkami oligo- a polysacharidů. Volné se vyskytují ve zralých obilných zrnech pouze v nepatrném množství, a to především v klíčku. Nejdůležitějšími monosacharidy v obilovinách jsou pentosy (arabinosa, xylosa, ribosa) a hexosy (glukosa, fruktosa, galaktosa, mannosy). Ve zralém neporušeném a suchém zrně se *oligosacharidy* vyskytují ve velmi nízkých koncentracích [17].

2.8.5 Polysacharidy obilovin

Z technologického hlediska jsou vedle bílkovin nejvýznamnější skupinou biopolymerů obilovin polysacharidy. Škrob je obsažen v zrnech obilovin v endospermu. Jeho obsah tvoří přibližně 60-75 % sušiny obilí a kolísá zhruba v uvedeném rozmezí podle odrůd. Jeho obsah v mouce, která je tvořena převážně endospermem, je ještě vyšší – cca 80 % [17].

Škrob se v obilovinách a rostlinách vyskytuje ve formě škrobových zrn, která se u jednotlivých druhů liší tvarem a velikostí [18].

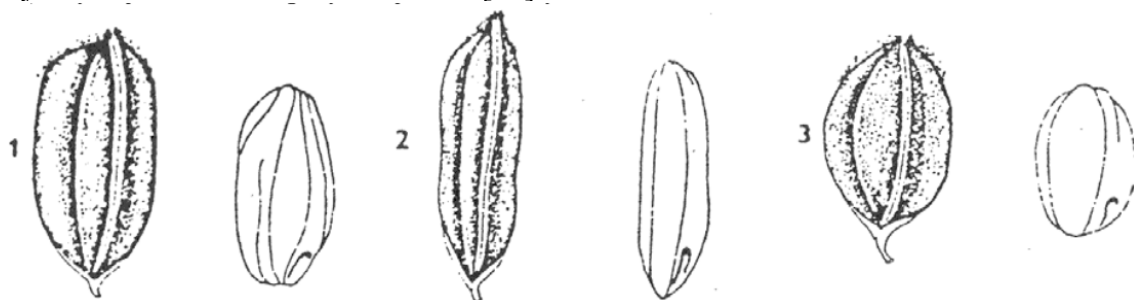
2.9 Rýže

Rýže, jako nejrozšířenější obilovina pro přímou konzumaci, je pěstována nejvíce v asijských a afrických zemích a zčásti v Americe. Rýže je jednou z nejhodnotnějších potravin, přes 85 % energie tvoří komplexní cukry, je lehce stravitelná, neobsahuje žádný cholesterol, má pouze stopové množství tuku, neobsahuje sodík ani lepek, hnědá rýže nadto obsahuje vysoké množství vlákniny [18, 20].

Roční světová produkce je přes 520 milionů tun, čímž se řadí na druhé místo za pšenici. V některých zemích tvoří 80 - 90 % energetické spotřeby potravin. Největšími producenty rýže jsou Čína (190 milionů tun ročně), Indie (124 milionů tun ročně) a Indonésie (50 milionů tun ročně). Prognózy uvádějí odhad celosvětové sklizně rýže v roce 2025 na 880 milionů tun.

Barva obilky je bělavá, žlutá až hnědá. Obilky rýže obsahují jen 7 % proteinů. Cenný je vysoký obsah škrobu. Nejvíce jsou ceněny takové obilky, u kterých po oloupaní a uhlazení má endosperm barvu sněhově bílou, méně žádané jsou druhy zbarvené žlutě až hnědě. Při loupání rýže i na moderních mlýnských strojích dochází k rozbití některých obilek, jejichž podíl činí až 20 %. Při větším podílu zlomku rýže se používá jako surovina pro výrobu škrobu nebo se zkvašuje [21].

Podle tvaru obilky rozeznáváme tři formy: japonské s obilkou kratší, indické s obilkou delší a javánské s obilkou téměř kulovitou [21].



Obr. 8 Rozlišení typů rýže seté podle tvaru a velikosti obilky

1 - japonská, 2 - indická, 3 - javánská, vlevo neloupaná, vpravo loupaná [21]

Na tuzemském trhu se můžeme setkat s bílou rýží (středně- a dlouhozrnnou, ze které jsou odstraněny všechny obaly), hnědou rýží natural (nemá odstraněnou poslední obalovou vrstvu obsahující vitamíny a minerální látky), rýží pololoupanou (má slupku obroušenou jen částečně), rýží ve varných sáčcích, rýží instantní a rýží „parboiled“ [20].

Rýže „parboiled“, v poslední době velmi oblíbená, se upravuje patentovaným technologickým postupem vyvinutým v USA zhruba před padesáti lety. Jedná se o čtyřfázovou hydrotermickou úpravu zrna, při níž se po namáčení neloupané rýže (paddy) působením vysokotlaké páry vtlačí dovnitř zrna rozpuštěné vitamíny a minerální látky z povrchových vrstev. Takto opracované zrna se potom zpracovává stejně jako běžné druhy rýže, tzn. loupáním a leštěním, ovšem minerální látky a vitamíny v zrna zůstávají. Působením zvýšené teploty se mění i struktura škrobu, což se projeví na vařivosti (rýže je velmi kyprá a nelepí se), udržuje si sypkou konzistenci i po delším vaření nebo stání při zvýšené teplotě. Na skus je poněkud pevnější (tužší). Při vaření absorbuje parboiled rýže více vody, což zlepšuje její výtěžnost. Barva syrové parboiled rýže je žlutá, varem však přejde v zářivě bílou. V úpravě parboiled se prodává i rýže natural. Parboiled rýže je z výživového hlediska

hodnotnější. Její energetický obsah je jen nepatrně vyšší, ale obsah vitamínů skupiny B, včetně niacinu a kyseliny listové, je v porovnání s běžnou loupanou rýží, jak uvádějí odborná hodnocení, téměř dvojnásobný. Pokud jde o množství minerálních látek, expertní studie se shodují, že u sodíku a draslíku jsou hodnoty zhruba stejné jako u běžné rýže. Zatímco hořčík a fosfor vykazuje mírné navýšení, obsah vápníku a železa dosahuje oproti klasické loupané rýži téměř dvojnásobku [20].

V poslední době se objevily nové druhy rýže, nabízející pozoruhodné a dosud neznámé příchutě. Nejrozšířenějšími z nich je rýže basmati, rýže jasmínová, rýže carnaroli. Velmi oblíbená je rovněž rýže divoká (planá, indiánská, Wild rice, Manhoomin). Její nutriční hodnota je poměrně vysoká, obsahuje zejména vitamíny skupiny B a draslík a je významným zdrojem vlákniny [20].

2.10 Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulosity pro výrobu bioethanolu

2.10.1 Charakteristika lignocelulosových materiálů

Materiály na bázi celulosy, mezi které patří zemědělské odpady jako obilná a kukuřičná sláma, kukuřičné oklasky, otruby a drť ze zpracování obilovin a rýže, představují perspektivní surovinu pro výrobu biopaliv. Vzhledem k tomu, že se z velké části jedná o odpadní materiály nebo části rostlin, které nemají potravinářské využití, jejich zdroje jsou obnovitelné a jejich cena je velmi nízká, mohly by teoreticky představovat ideální surovinu pro biotechnologický proces.

Hlavní překážkou masivního využití odpadní fytomasy je však zejména komplexita materiálu, který kromě celulosy obsahuje i hemicelulosu a lignin, jež jsou vzájemně pevně provázány a tvoří komplexní rigidní matici. Kromě těchto hlavních tří složek se v malém množství vyskytují též proteiny, pektiny, minerální látky, taniny nebo tuky [22].

Biotechnologicky nejdůležitější složkou fytomasy je celulóza, která je lineárním polymerem složeným z D-glukosových jednotek vázaných β -1,4 glykosidovými vazbami a v rostlinném materiálu se vyskytuje převážně v krystalické a v menší míře i amorfní formě. Jednotlivá celulosová vlákna jsou organizována do fibril, zpevněna vodíkovými vazbami a asociována s dalšími ochrannými polymerními strukturami, které jsou tvořeny zejména ligninem a hemicelulosou [23].

Hemicelulóza zprostředkovává spojení mezi celulosovými vlákny a ligninem a je složena převážně z pentos, hexos a uronových kyselin, přičemž převažující složkou jsou xylany a glukomanany [24].

Lignin, amorfní heteropolymer složený převážně z fenylypropanových jednotek (p-kumarylalkoholu, konyferylalkoholu a sinapylalkoholu) tvoří nepropustnou prostorovou strukturu odolnou vůči mikrobiálnímu rozkladu a oxidaci a z tohoto důvodu představuje i hlavní překážku degradace lignocelulosového materiálu.

2.10.2 Enzymová hydrolýza lignocelulosových materiálů

Lignocelulosový materiál, který byl podroben fyzikálně-chemickému procesu, je nutno v dalším kroku podrobit působení celulolytických enzymových preparátů, které jsou komerčně dostupné, a které jsou schopné rozložit polymerní řetězec celulosy tak, aby vznikly redukující cukry, které jsou využitelné při fermentaci. Při rozkladu celulosy se uplatňují nejvíce tři typy enzymů – endoglukanasy, které štěpí polysacharidový řetězec uvnitř a produkují směs oligosacharidů o různé molekulové hmotnosti, exoglukanasy, které štěpí koncové řetězce poly- a oligosacharidů a uvolňují z nich celobiosu a glukosu, zatímco β -glukosidasy hydrolyzují vzniklou celobiosu [25].

2.10.3 Fermentační výroba bioethanolu

Lignocelulosové materiály jsou po ukončení enzymové hydrolýzy použity pro přípravu médií pro navazující biotechnologický proces. Jelikož však často obsahují velmi zředěné roztoky zkvasitelných sacharidů a jsou chudé i na zdroje ostatních živin (dusík, fosfor, stopové prvky, vitamíny), které jsou nezbytné pro metabolismus mikroorganismů, je nutné tyto živiny doplnit např. přidáním kukuřičných výluhů nebo kvasničného extraktu před tím, než je do média zaočkována produkční kultura. Pro tyto účely je používána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, z bakterií je jako producent ethanolu vhodná *Zymomonas mobilis*, často je zmiňována i termofilní anaerobní bakterie *Clostridium thermocellum*, která je vzhledem k přítomnosti celulosomu schopna zužitkovat jak glukosu, tak i celobiosu a celulosu, její nevýhodou je však nízká tolerance ke vznikajícímu ethanolu [26].

2.11 Výroba a využití bioplynu

Při výrobě bioplynu se jedná o anaerobní fermentaci (methanové kvašení). Zjednodušeně lze uvést, že tato technologie využívaná v bioplynových stanicích je biologický rozklad organických látek v anaerobním prostředí. Jedná se o bioenergetickou transformaci organických látek, při které nedochází ke snížení jejich hnojivé hodnoty. Výslednými produkty jsou biologicky stabilizovaný substrát s vysokým hnojivým účinkem a bioplyn s obsahem 55-70 % methanu [27].

2.11.1 Možnosti využití bioplynu

Produkty anaerobní fermentace jsou bioplyn a biologicky stabilizovaný substrát. Bioplyn je vysoce kvalitní obnovitelný zdroj energie, který poskytuje celou řadu možností energetického využití. Je možné jej využívat podobně jako jiná plynná paliva. Mezi nejčastější způsoby využití bioplynu patří: přímé spalování (topení, sušení, chlazení, ohřev užitkové vody apod.), výroba elektrické energie, ohřev teplotnosného média a výroba chladu, pohon spalovacích motorů nebo turbín pro získání mechanické energie, využití bioplynu v palivových článcích [27].

2.11.2 Zdroje pro výrobu bioplynu

Nejvíce materiálů vhodných pro výrobu bioplynu je produkováno v zemědělství. Jedná se zejména o exkrementy hospodářských zvířat, vedlejší produkci z rostlinné výroby a cíleně pěstované energetické plodiny. Velké množství zbytkové biomasy je vyprodukováno také v navazujícím potravinářském průmyslu. Významný potenciál pro budoucí energetické využití v sobě zahrnují také biologicky rozložitelné komunální odpady. Vyprodukovanou biomasu lze rozdělit na dvě základní skupiny – záměrně pěstovanou a odpadní [27].

2.12 Mikroorganismy rodů *Rhodotorula* a *Bacillus*

Rhodotorula glutinis je všeobecně známa jako karotenogenní kvasinka. *RG* je potenciálně užitečná pro průmysl, protože je schopna růst v různých levných zemědělských surovinách jako je šťáva cukrové třtiny, rašelinový extrakt, syrovátka, hroznový mošt, řepná melasa [28]. Karotenoidy jsou důležité přírodní pigmenty žluté, oranžové a červené barvy, nalezeny široce u mikroorganismů a rostlin. Průmyslové karotenoidní pigmenty jako je β -karoten jsou používány jako přírodní barviva potravin nebo krmiv a jako doplňkové látky v zemědělství. β -karoten je oranžovo-červené barvivo z rodiny karotenoidů, který vykazuje protinádorové a antioxidační vlastnosti [29].

Rod *Bacillus* je velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Jeho druhy mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, které štěpí škrob, řada druhů má pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny, a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy. Určité druhy slouží pro průmyslovou přípravu enzymů. Druh *Bacillus subtilis* je v přírodě nejrozšířenější a je téměř všudypřítomný. Tvoří malé peritrichní buňky a produkuje několik polypeptidových antibiotik. Bakteriální amylasy získané z *BS* se uplatňují v pivovarství a v textilním průmyslu, proteiny se používají především do pracích prostředků [30].

Zástupci obou uvedených druhů jsou vhodnými modelovými systémy k testování využitelnosti průmyslových odpadních substrátů k produkci dalších typů fyziologicky i průmyslově významných metabolitů.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo analyzovat obsah sacharidů a glykosidů v různých druzích rýže a dalších cereálních substrátech, sledovat jejich změny v průběhu chemické a enzymové hydrolýzy a testovat jejich možné využití průmyslovými mikroorganismy.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje, materiál

4.1.1 Použité chemikálie

Uhličitan sodný bezvodý p.a. - LachNer (ČR)
Hydrogenuhličitan sodný p.a. - LachNer (ČR)
Síran sodný bezvodý p.a. - LachNer (ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát p.a. - Lachema (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a. - Lachema (ČR)
Molybdenan amonný p.a. - Mach Chemikálie (ČR)
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát, 98% - Sigma-Aldrich (Indie)
Fenol p.a. - LachNer (ČR)
Kyselina sírová, 96% - LachNer (ČR)
Hexakynoželezitan draselný p.a. - Lachema (ČR)
Octan zinečnatý dihydrát p.a. LachNer (ČR)
Kyselina octová, 99,8% - LachNer (ČR)
Dusitan sodný p.a. - LachNer (ČR)
Chlorid hlinitý p.a. - LachNer (ČR)
Hydroxid sodný p.a. - Lachner (ČR)
Methanol p.a. - LachNer (ČR)
Nitril kyseliny octové, 99,9% - LachNer (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo
Kyselina chlorovodíková, 35% - LachNer (ČR)
Síran manganatý, 99% - Sigma-Aldrich (Japonsko)
Pepton, bakteriological - HiMedia (Itálie)
Beef Extract Powder - HiMedia (Itálie)
D-glukosa monohydrát p.a. - LachNer (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. - LachNer (ČR)
Síran amonný p.a. - LachNer (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a. - Lachema (ČR)

4.1.2 Použité přístroje

Spektrofotometr – Helios δ , Unicam (Velká Británie)
Spektrofotometr – Helios α , ThermoSpectronic (Velká Británie)
Analytické váhy – Boeco (Německo)
Vortex –TK3S, TecnoKartell (Německo)
Vortex – Heidolph, Vitrum (Německo)
Mikropipety – Discovery (Německo)
Mikropipety – BioHit Proline (Finsko)
Centrifuga – U – 32, Boeco (Německo)

Vodní lázeň – EL – 20D, Kavalier (ČR)
Centrifuga – C – 28, Boeco (Německo)
Centrifuga – Mikro 200, Vitrum (Německo)
Ultrazvuk – PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
Filtr – MS[®] Nylon Syringe Filter, velikost pórů 0,45 μm

Analýza sacharidů pomocí HPLC/RI

Kolona – Supelcosil, LC-NH₂, 5 μm, 4,6 x 250 mm, Supelco
Držák předkolony – KJO-4282, Ecom (ČR)
Předkolony – NH₂, 4 x 3,0 mm, AJO-4302, Phenomenex
Soustava HPLC, Ecom spol. s r.o. (ČR):
 Detektor – RIDK 102, Laboratorní přístroje Praha
 Termostat – LCO 101 – Column oven
 Gradient – Gradient programmer GP5, Ecom (ČR)
 Pumpa – LCP 4020, Ecom (ČR)
 Degaser – DG-1210
Vyhodnocovací program Clarity (verze 2.5.6.99)

4.1.3 Použitý materiál

Rýže:

Long grain white rice, 1 kg
Long grain white rice, varné sáčky
Rýže Bask, 1 kg
SOS Clasic, 1 kg
SOS Long, 1 kg
Rýže dlouhozrná loupaná,
Menu zlaté
Menu zlaté Parboiled
Albert Bio
Lagris, rýže dlouhozrná
Lagris, rýže dlouhozrná Parboiled
Rýže natural BIO

Ostatní substráty:

Jablečná vláknina, Provita
Pšeničné otruby, Evit
Babiččiny vaječné nudle, Anirex
Vaječné těstoviny, Ideal Slovakia

4.1.4 Použité mikroorganismy a enzymy

Ke kultivaci byly použity tyto mikroorganismy:

Rhodotorula glutinis RG 20-2-33
Bacillus subtilis subsp. *subtilis* CCM 2722

Enzymy použité na enzymovou hydrolyzu:

AMG – amyloglukosidasa Novo, exo-1,4- α -D-glukosidasa (glukoamylasa), vznik ze submerzní fermentace pomocí *Aspergillus niger*. Hydrolyzuje 1,4- α a 1,6- α -glykosidické vazby ve škrobu. Odštěpuje jednotky z neredukujícího konce. $T_{opt.} = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH_{opt.} = 4$ [31].

Viscozyme – tekutý multienzymový komplex obsahující arabinasu, β -glukanasu, hemicelulasu, celulasu a xylanasu. Je produkovaný *Aspergillus acetuleatus* s aktivitou 100 FBG fungálních β -glukanasových jednotek na gram. $T_{opt.} = 25 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH_{opt.} = 3,3 - 5,5$ [32].

4.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno spektrofotometricky při 750 nm za použití Folin-Ciocalteuova činidla [33].

Byl připraven nasycený roztok Na_2CO_3 (7,5 g Na_2CO_3 bylo rozpuštěno v 95 ml vody) a zředěný roztok Folin-Ciocalteuova činidla v poměru s vodou 1:9.

Vzorky byly naváženy na požadované množství s přesností na 4 desetinná místa a rozpuštěny v požadovaném množství vody, vzorky byly extrahovány ve vodě po dobu 1 hodiny. Poté tato připravená směs byla centrifugována při 6000 otáčkách po dobu 5 minut. Při vlastním stanovení bylo do zkumavky vždy napipetováno po 1 ml zředěného FC činidla, 1 ml vody a 100 μl extraktu. Roztok byl ve zkumavkách promíchán a nechán stát. Po 5 minutách byl do každé zkumavky napipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a opět bylo vše dobře promícháno. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 750\text{ nm}$ proti slepému vzorku.

4.3 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno spektrofotometricky smícháním vzorku s vodou, dále za účasti 5% roztoku NaNO_2 , 10% AlCl_3 a 1M NaOH , absorbance byla změřena při vlnové délce $\lambda = 510\text{ nm}$. Před měřením byl připraven 5% roztok dusitanu sodného, 10% chlorid sodný a 1M hydroxid sodný [34].

Vzorky byly naváženy na požadované množství s přesností na 4 desetinná místa a rozpuštěny v požadovaném množství vody a byly extrahovány ve vodě po dobu 1 hodiny. Poté byla směs centrifugována při 6000 otáčkách po dobu 5 minut. Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml extraktu a 1,5 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného, důkladně promícháno a necháno 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, opět důkladně promícháno a necháno 5 minut stát. Nyní byl přidán 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 510\text{ nm}$ proti slepému vzorku (fyziologickému roztoku).

4.4 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Nejprve byl připraven roztok 5% fenolu, dále roztoky Carrez I (106 g hexakyanoželezitanu draselného bylo doplněno v odměrné baňce vodou na objem 1000 ml) a Carrez II

(219 g octanu zinečnatého a 30 ml ledové kyseliny octové bylo doplněno v odměrné baňce vodou na objem 1000 ml) [9].

Vzorky byly rozemlety v mlýnku, požadované množství bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa a rozpuštěno v požadovaném množství vody. Směs byla extrahována po dobu 3 hodin. Poté byly přidány čeřící roztoky Carrez I a za stálého míchání Carrez II (množství Carrez I a Carrez II musí odpovídat 10 % celkového množství) a poté byla směs odstředěna při 6000 ot. po dobu 5 minut.

Celkové sacharidy byly stanoveny spektrofotometricky podle Duboise. Ke stanovení byl pipetován 1 ml extraktu vzorku, k němu byl přidán 1 ml 5% fenolu a 5 ml konc. H_2SO_4 . Směs byla protřepána a ponechána stát při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Absorbance byla změřena při vlnové délce $\lambda = 490 \text{ nm}$ proti slepému vzorku [35].

4.5 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona

Nejprve byly připraveny roztoky Somogyi-Nelsona. Roztok I byl připraven smísením 24 g bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3), 16 g hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3), 144 g bezvodého síranu sodného (Na_2SO_4), 12 g vinanu sodno-draselného a vše bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Roztok II byl připraven smísením 4 g pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 24 g bezvodého síranu sodného a vše bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Roztok III byl připraven smísením 25 g molybdenanu amonného rozpuštěného ve 450 ml destilované vody, 21 ml koncentrované kyseliny sírové, 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) rozpuštěného v 25 ml destilované vody. Roztok byl nechán stát 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě [36].

Vzorek rýže byl rozemlet v mlýnku, požadované množství bylo zváženo s přesností na 4 desetinná místa a vzorek byl extrahován ve vodě po dobu 3 hodin. Poté byl přidán čeřící roztok Carrez I a za stálého míchání byl přidáván roztok Carrez II (množství Carrez I a Carrez II musí odpovídat 10 % celkového množství). Směs byla centrifugována při 6000 otáčkách po dobu 5 minut.

K 1 ml roztoku vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Zkumavky byly umístěny na vroucí vodní lázeň a byly vařeny po dobu 10 minut. Poté byly zkumavky ochlazeny vodou, bylo přidáno 0,5 ml roztoku III, dobře promícháno (až se vzniklý Cu_2O rozpustil) a destilovanou vodou bylo doplněno na objem 10 ml. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 720 \text{ nm}$ proti slepému vzorku [36].

4.6 Analýza sacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze

Nejprve byl připraven roztok 50% methanolu, roztok 1,2 M HCl a nasycený roztok NaHCO_3 (9,6 g na 100 g vody).

Navážka vzorku byla přesypána do varné baňky, bylo přidáno 50 ml 50% methanolu a 30 ml 1,2 M kyseliny chlorovodíkové a ve vodní lázni zahřáté na 100°C ponecháno hydrolyzovat 2 hodiny. Poté bylo pH roztoku upraveno na $\text{pH} = 3$ roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Dále byl vzorek zfiltrován přes gázu, objem byl změřen ve válcích a centrifugováno při 6000 otáčkách po dobu 5 minut. Takto připravený vzorek byl použit pro stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona - viz kap. 3.5. Zbytek byl zfiltrován přes mikrofiltr a centrifugováno při 10000 otáčkách po dobu 5 minut. Takto

připravený roztok byl použit pro přímé nástřiky na kolonu k analýze mono- a disacharidů. Při přípravě kyselého hydrolyzovaného substrátu pro produkční médium byla změna v upravování pH. pH bylo upravováno pomocí krystalků NaOH na pH = 6 a poté doplněno vodou na požadovaný objem.

4.7 Analýza mono- a disacharidů ve vzorcích pomocí metody HPLC

Vzorek byl rozemlet v mlýnku, požadované množství vzorku navážené s přesností na 4 desetinná místa bylo extrahováno ve vodě. Vzorek extrahován ve vodě 3 hodiny byl vyčeřen Carrezovými činidly a poté centrifugován při 6000 otáčkách po dobu 5 minut, zfiltrován přes mikrofiltr a znovu centrifugován při 10000 otáčkách po dobu 10 minut. Takto připravený roztok byl použit k přímému nástřiku na kolonu.

Stanovení sacharidů bylo provedeno metodou HPLC, kde byla použita kolona Supelcosil, LC-NH₂. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril : H₂O v poměru 75 : 25. Průtok byl nastaven pro mono- a disacharidy na 1,0 ml/min. Detekce byla provedena pomocí refraktometrického detektoru.

4.8 Analýza sacharidů ve vzorcích po enzymové hydrolýze

Vybraná neloupaná a loupaná rýže byla podrobena enzymové hydrolýze. Na hydrolýzu bylo použito na 1000 ml 30 g rýže rozemleté v mlýnku. Připravené množství rýže bylo rozpuštěno ve vysterilovaném kultivačním médiu, přidáno 2,7 ml 100krát zředěného enzymu AMG a 2,7 ml 100krát zředěného enzymu Viscozyme a ponecháno stát 24 hodin. Po 2. sterilaci byla zaočkována kvasinky *Rhodotorula glutinis*, u druhého experimentu bakterie *Bacillus subtilis*. Po 80 hodinách u kvasinky a 30 hodinách u bakterie byla ukončena kultivace mikroorganismů. K analýze byly odebírány vzorky po 1. sterilaci, po enzymové hydrolýze, po 2. sterilaci a po ukončení kultivace mikroorganismů.

4.9 Kultivace mikroorganismů

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* patří mezi mezofilní, aerobní mikroorganismy. Jejich kultivace na produkčních médiích byla prováděna při teplotě 25 °C za neustálého třepání a osvětlení kvůli tvorbě karotenoidů po dobu 80 hodin. Sterilizace kultivačních médií byla provedena v tlakovém hrnci po dobu 30 minut.

Bakterie *Bacillus subtilis* patří mezi aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. Jejich kultivace na produkčních médiích byla prováděna při teplotě 30 °C za neustálého třepání po dobu 30 hodin.

Sterilizace kultivačních médií byla provedena v tlakovém hrnci po dobu 30 minut.

4.9.1 Inokulum I

Pro každý mikroorganismus bylo připraveno inokulum I o požadovaném množství tak, aby poměr INO I : INO II byl 1 : 5. Do připraveného vysterilovaného a vychladnutého inokula I byly naočkovány tři plné kličky zásobní kultury dostupných na Petriho miskách. Složení

inokula I je uvedeno v tabulkách, zvlášť pro složení inokula I pro kvasinku, které je uvedeno v *tab. 3* a složení inokula I pro bakterii je uvedeno v *tab. 4*. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin.

Tab. 3 Složení inokula I pro kvasinku

Složení	Množství
Glukosa	40 g
KH_2PO_4	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696 g
Kvasničný autolyzát	7 g
Vodovodní voda	1000 ml

Tab. 4 Složení inokula I pro bakterii

Složení	Množství
Pepton	5 g
Beef Extract	3 g
MnSO_4	0,1 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.9.2 Inokulum II

Pro kvasinku bylo připraveno inokulum II tak, aby poměr INO I:INO II byl 1:5. Po vysterilování a vychladnutí inokula II bylo inokulum I sterilně přelito do inokula II a kultivováno po dobu 24 hodin. Toto inokulum II již tvořilo základ pro kultivaci produkčních médií. Složení inokula II je uvedeno v *tab. 5*.

Tab. 5 Složení inokula II

Složení	Množství
Glukosa	40 g
KH_2PO_4	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696 g
Kvasničný autolyzát	7 g
Vodovodní voda	1000 ml

4.9.3 Produkční média

Pro inokulum II u kvasinek a pro inokulum I u bakterií byla připravena produkční média. Základ produkčních médií byl stejný, u kvasinek je uveden v *tab. 6* a u bakterií v *tab. 7*. Rozdíly složení médií ve zdroji uhlíku jsou pro kvasinky a bakterie uvedeny v *tab. 8*. Jako zdroj uhlíku byla použita glukosa (kontrola), dále loupaná a neloupaná rýže, která byla volně extrahována ve vodě, kyselé hydrolyzována a enzymově hydrolyzována. U kvasinek bylo přilito takové množství INO II do produkčního média, aby poměr INO II : produkční médium

byl 1 : 5. U bakterií byly sterilně pipetovány 3 ml INO I do produkčních médií. Produkční média u kvasinek byla kultivována po dobu 80 hodin a u bakterií po dobu 30 hodin.

Tab. 6 Složení produkčního média u kvasinek – základ

Složení	Množství
KH_2PO_4	4 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696 g
Vodovodní voda	1000 ml

Tab. 7 Složení produkčního média u bakterií – základ

Složení	Množství
Pepton	10 g
Beef Extract	6 g
MnSO_4	0,1 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 8 Složení produkčních médií (kvasinky, bakterie)

Název	Složení
Extrakce ve vodě	
Kontrola	základ + glukosa 30 g/l
Loupaná rýže	základ + loupaná rýže 30 g/l
Neloupaná rýže	základ + neloupaná rýže 30 g/l
Kyselá hydrolýza	
Loupaná rýže	základ + loupaná rýže 30 g/l
Neloupaná rýže	základ + neloupaná rýže 30 g/l
Enzymová hydrolýza	
Loupaná rýže	základ + loupaná rýže 30 g/l
Neloupaná rýže	základ + neloupaná rýže 30 g/l

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno podle postupu uvedeného v předchozí kapitole (viz kap. 4.2). Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky a každý vzorek byl změřen třikrát proti slepému vzorku. Naměřené hodnoty absorbance byly převedeny pomocí regresní rovnice $A = 1,4974 \cdot c$ na skutečné koncentrace polyfenolů z nichž byl vypočten průměr a které jsou uvedeny v tab. 9. Graficky znázorněný obsah celkových polyfenolů je uveden níže v grafu 1 společně s obsahem celkových flavonoidů.

Tab. 9 Průměrný obsah celkových polyfenolů v jednotlivých druzích rýže

Vzorek	Obsah (mg/100g výrobku)
Long grain white rice, 1 kg	17,09 ± 0,09
Long grain white rice, varné sáčky	33,30 ± 1,08
Rýže Bask, 1 kg	21,38 ± 1,28
SOS Clasic, 1 kg	28,59 ± 0,55
SOS Long, 1 kg	21,92 ± 0,77
Rýže dlouhozrná loupáná,	20,79 ± 0,38
Menu zlaté	31,16 ± 1,02
Menu zlaté Parboiled	31,91 ± 0,98
Lagris, rýže dlouhozrná	26,26 ± 0,57
Lagris, rýže dlouhozrná Parboiled	25,44 ± 0,16
Rýže natural BIO	55,96 ± 0,44

Průměrné hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozmezí od 17,09 mg/100 g výrobku do 33,30 mg/100 g výrobku. Výjimku zde tvořila Rýže natural BIO, která měla průměrný obsah celkových polyfenolů 55,96 mg/100 g výrobku.

Nejvyšší průměrný obsah celkových polyfenolů obsahovala rýže s názvem Rýže natural BIO. Tato rýže byla neloupaná a po extrakci ve vodě byl zjištěný nejvyšší obsah polyfenolů ze všech zkoumaných rýží. Vysoký obsah celkových polyfenolů obsahovala rýže s názvem Long grain white rice ve varných sáčkích, nejméně rýže s názvem Long grain white rice v balení 1 kg. Spolu s rýží Long grain white rice ve varných sáčkích měla vysoké množství rýže Menu zlaté Parboiled, která je zpracována hydrotermickou úpravou Parboiled. Další rýže zpracována touto technikou byla Lagris, rýže dlouhozrná Parboiled, která měla srovnatelný obsah celkových polyfenolů jako Lagris, rýže dlouhozrná. Celkově rýže Menu zlaté a Menu zlaté Parboiled měly vysoký obsah celkových polyfenolů oproti ostatním rýžím. Další rýže, která měla zvýšený obsah celkových polyfenolů se nazývá SOS Clasic, která má kulaté zrna, zatímco rýže SOS Long, která má dlouhá zrna, obsahuje výrazně nižší množství celkových polyfenolů. Množství fenolických látek bylo měřeno jako doplňkový parametr k orientačnímu posouzení složení glykosidů rýže.

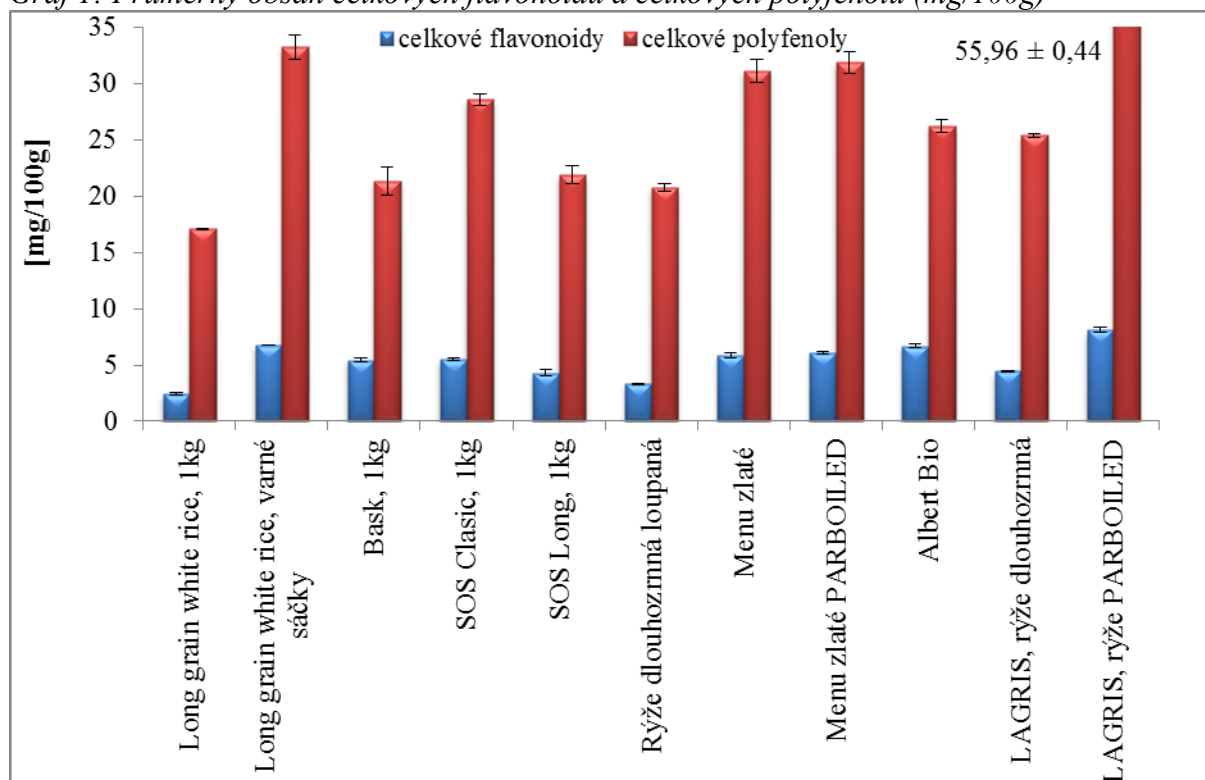
5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno spektrofotometricky podle postupu v předchozí kapitole (viz kap. 4.3). Každý vzorek byl změřen třikrát, naměřené hodnoty absorbance byly převedeny pomocí regresní rovnice $A = 3,1541 \cdot c$ na skutečné koncentrace, z nichž byl vypočten průměr. Tyto hodnoty jsou uvedeny v *tab. 10* společně s hodnotami podílu celkových flavonoidů z celkových polyfenolů. Graficky znázorněný obsah celkových flavonoidů je uveden v grafu 1 společně s obsahem celkových polyfenolů. Grafické znázornění podílu celkových flavonoidů z celkových polyfenolů je uvedeno v grafu 2.

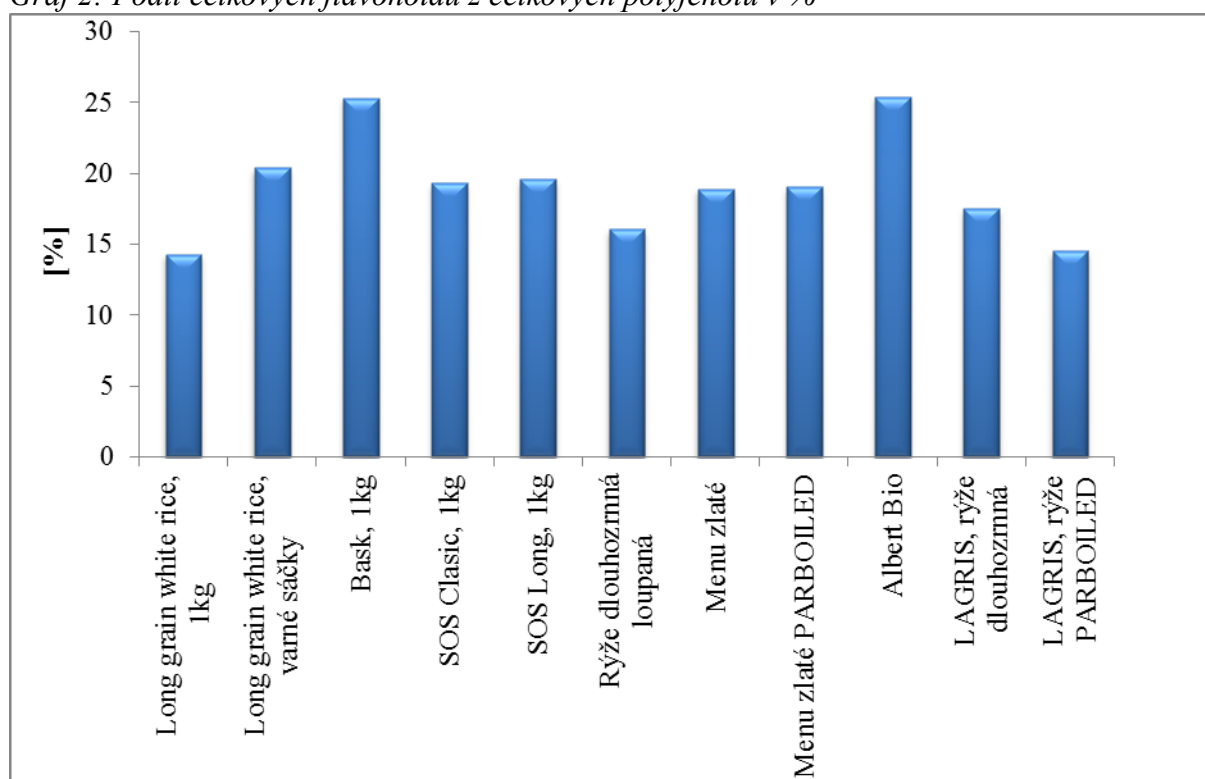
Tab. 10 Průměrný obsah celkových flavonoidů v jednotlivých druzích rýže

Vzorek	Obsah (mg/100g výrobku)	Podíl celkových flavonoidů z celkových polyfenolů [%]
Long grain white rice, 1 kg	$2,45 \pm 0,07$	14,32
Long grain white rice, varné sáčky	$6,79 \pm 0,03$	20,40
Rýže Bask, 1 kg	$5,42 \pm 0,18$	25,35
SOS Clasic, 1 kg	$5,52 \pm 0,15$	19,32
SOS Long, 1 kg	$4,30 \pm 0,28$	19,60
Rýže dlouhozrná loupaná,	$3,34 \pm 0,04$	16,05
Menu zlaté	$5,89 \pm 0,23$	18,90
Menu zlaté Parboiled	$6,08 \pm 0,07$	19,05
Lagris, rýže dlouhozrná	$6,68 \pm 0,18$	25,43
Lagris, rýže dlouhozrná Parboiled	$4,46 \pm 0,04$	17,54
Rýže natural BIO	$8,13 \pm 0,26$	14,53

Graf 1: Průměrný obsah celkových flavonoidů a celkových polyfenolů (mg/100g)



Graf 2: Podíl celkových flavonoidů z celkových polyfenolů v %



Při stanovení celkových flavonoidů se hodnoty pohybovaly v rozmezí od 2,45 mg/100 g výrobku do 8,13 mg/100 g výrobku.

Průměrné obsahy celkových flavonoidů v těchto vzorcích rýží si jsou hodně podobné. Ovšem stejně jak u celkových polyfenolů byl nejvyšší obsah celkových flavonoidů u rýže s názvem Rýže natural BIO, kde zrna rýže byla rozemleta. Vysoký průměrný obsah má také rýže s názvem Long grain white rice ve varných sáčcích. Velmi blízko je této rýži Lagris, rýže dlouhozrná, která u celkových polyfenolů měla zvýšený obsah. Rýže Menu zlaté a Menu zlaté Parboiled mají opět vyšší obsah celkových flavonoidů, stejně, jak tomu bylo u celkových polyfenolů. Nejméně celkových flavonoidů obsahovala rýže s názvem Long grain white rice v balení 1 kg. Tato rýže obsahovala i nejméně celkových polyfenolů. Jako druhá nejhorší rýže byla stejně jako u celkových polyfenolů Rýže dlouhozrná loupaná. Vyšší obsah flavonoidů obsahuje i rýže Bask a SOS Clasic. SOS Long měla nižší množství celkových flavonoidů než SOS Clasic. SOS Clasic tedy měla v obou experimentech vyšší množství. Menu zlaté Parboiled měla vyšší obsah celkových flavonoidů a polyfenolů než Menu zlaté.

Při srovnání podílů celkových flavonoidů z celkových polyfenolů se hodnoty pohybovaly od 14,32 % do 25,43 %. Z grafu bylo rozpoznáno, že u některých rýží flavonoidy nepředstavují velký podíl, ale u některých rýží představují i čtvrtinu celkových polyfenolů. Nejmenší podíl flavonoidů bylo prokázáno v rýži s názvem Long grain white rice v balení 1 kg, která má i nejmenší obsah celkových flavonoidů a polyfenolů. Velmi malý podíl má Rýže natural BIO, která má nejvyšší průměrný obsah celkových polyfenolů i flavonoidů. Vysoký podíl celkových flavonoidů z polyfenolů obsahovaly rýže Bask a Lagris, rýže dlouhozrná.

Rovněž množství flavonoidů bylo měřeno jako doplňkový parametr k orientačnímu posouzení složení glykosidů rýže. Hodnoty fenolických látek jsou v analyzovaných druzích podobné, liší se podle technologické úpravy, míry rozemletí a rovněž původu a charakteru rýže.

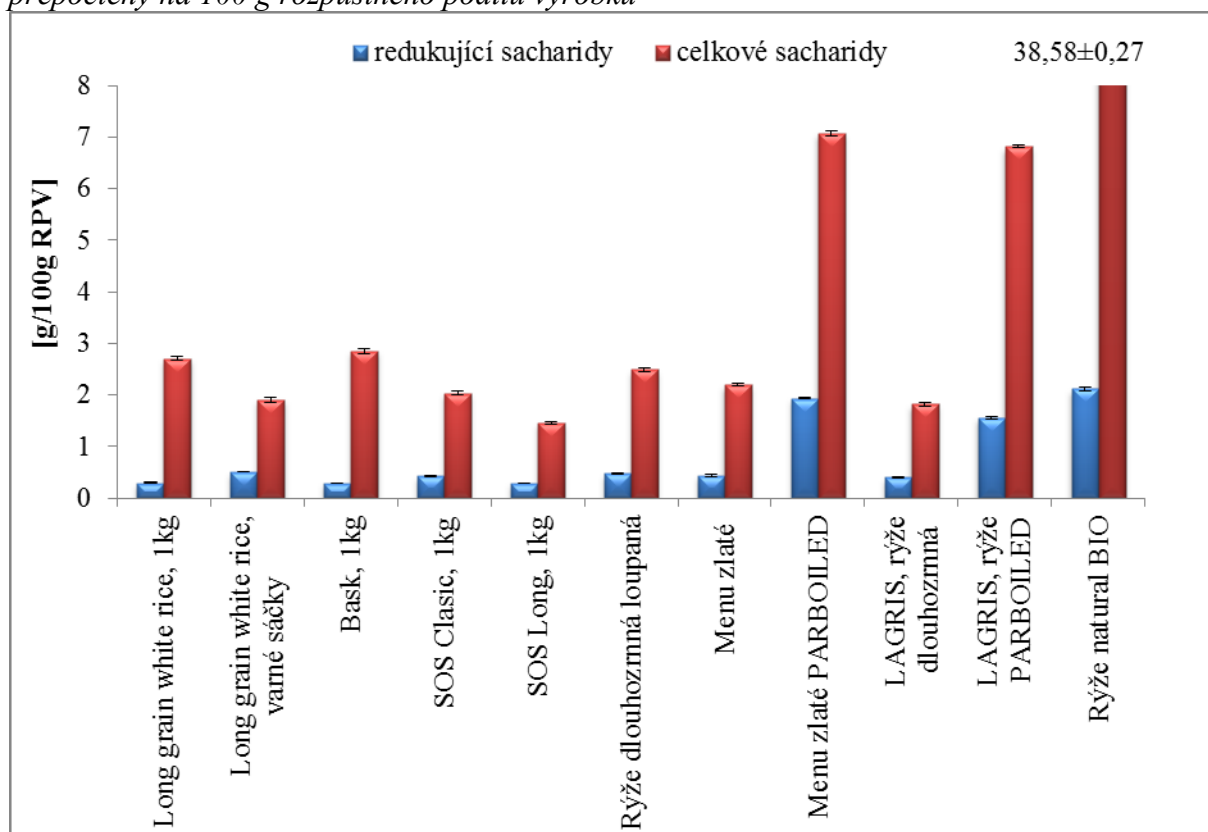
5.3 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Celkové sacharidy dle Duboise byly stanoveny spektrofotometricky podle postupu v kap. 4.4. Každý vzorek byl proměřen třikrát proti slepému vzorku. Obsah celkových sacharidů byl vypočten z kalibrační rovnice $A = 0,0089914 \cdot c$. Obsah celkových sacharidů byl přepočten na rozpustný podíl výrobku. Obsah celkových sacharidů, obsah celkových sacharidů v rozpustném podílu výrobku (RPV) a rozpustný podíl výrobku v % je uveden v tab. 11. V tab. 12 je uveden obsah celkových sacharidů u ostatních substrátů. Graficky znázorněný obsah celkových sacharidů je v grafu 3 spolu s obsahem redukujících sacharidů.

Tab. 11 Průměrný obsah celkových sacharidů v jednotlivých druzích rýže

Vzorek	Obsah (mg/100g výrobku)	Obsah (g/100 g RPV)	RPV [%]
Long grain white rice, 1 kg	258,05 ± 2,56	2,71 ± 0,03	9,52
Long grain white rice, varné sáčky	175,91 ± 4,30	1,91 ± 0,05	9,23
Rýže Bask, 1 kg	285,57 ± 5,54	2,85 ± 0,06	10,02
SOS Clasic, 1 kg	256,09 ± 4,49	2,03 ± 0,04	12,60
SOS Long, 1 kg	182,52 ± 3,27	1,46 ± 0,03	12,49
Rýže dlouhozrná loupaná	243,36 ± 2,84	2,49 ± 0,03	9,77
Menu zlaté	172,02 ± 2,14	2,20 ± 0,03	7,81
Menu zlaté Parboiled	711,37 ± 4,69	7,08 ± 0,05	10,05
Lagris, rýže dlouhozrná	189,16 ± 4,25	1,82 ± 0,04	10,40
Lagris, rýže dlouhozrná Parboiled	746,00 ± 3,20	6,83 ± 0,03	10,93
Rýže natural BIO	3 839,14 ± 27,26	38,58 ± 0,27	9,95

Graf 3: Průměrný obsah celkových a redukujících sacharidů v různých druzích rýže přepočtený na 100 g rozpustného podílu výrobku



Průměrný obsah celkových sacharidů přepočtený na 100 g rozpustného podílu byl v rozmezí od 1,46 g/100 g RPV do 7,08 g/100 g RPV. Výjimku tvořila neloupaná Rýže natural BIO, která obsahovala 38,58 g/100 g RPV.

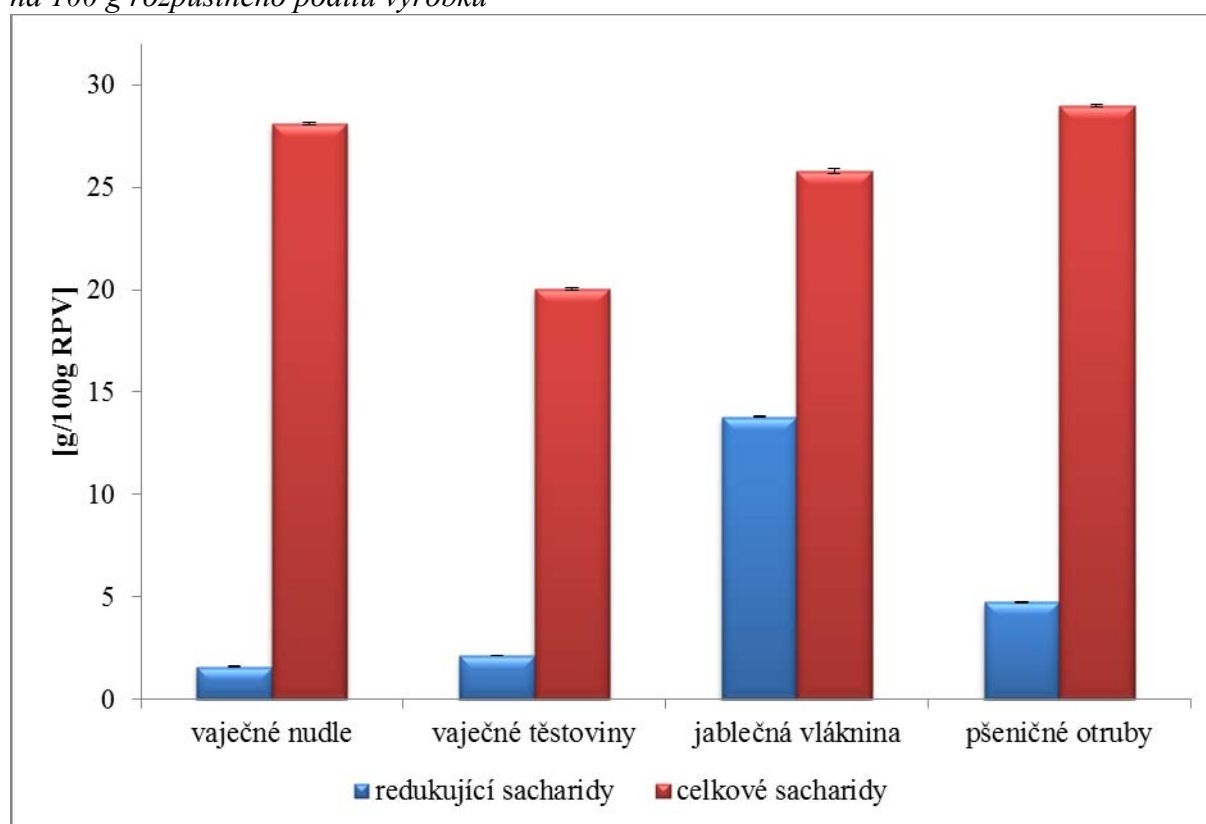
Nejvyšší průměrný obsah celkových sacharidů obsahovala neloupaná Rýže natural BIO. Vyšší koncentraci celkových sacharidů obsahovala rýže Menu zlaté PARBOILED a LAGRIS, rýže dlouhozrná. Nejnižší koncentrace celkových sacharidů obsahovala rýže SOS Long. Ostatní rýže měly obsah celkových sacharidů velmi podobný. Ze získaných výsledků lze

usoudit, že většina sacharidů rýže se nachází v nerozpustném podílu, jenž by mohl být pro případné využití hůře dostupný.

Tab. 12 Průměrný obsah celkových sacharidů u ostatních substrátů

Vzorek	Obsah (g/100 g výrobku)	Obsah (g/100 g RPV)	RPV [%]
Jablečná vláknina PROVITA	5,18 ± 0,06	25,79 ± 0,39	28,58
Vaječné nudle ANIREX	3,51 ± 0,05	28,07 ± 0,33	18,46
Pšeničné otruby EVIT	7,37 ± 0,11	28,95 ± 0,17	31,42
Vaječné těstoviny IDEAL	9,10 ± 0,05	20,04 ± 0,26	17,52

Graf 4: Průměrný obsah celkových a redukujících sacharidů u ostatních substrátů přepočtený na 100 g rozpustného podílu výrobku



Průměrný obsah celkových sacharidů u ostatních substrátů přepočtený na 100 g rozpustného podílu výrobku se pohyboval v rozmezí od 20,04 g/100 g RPV do 28,95 g/100 g RPV.

Největší koncentrace celkových sacharidů byla zjištěna u pšeničných otrub a vaječných nudlí. Naopak nejmenší koncentrace celkových sacharidů obsahovaly vaječné těstoviny.

5.4 Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyiho-Nelsona

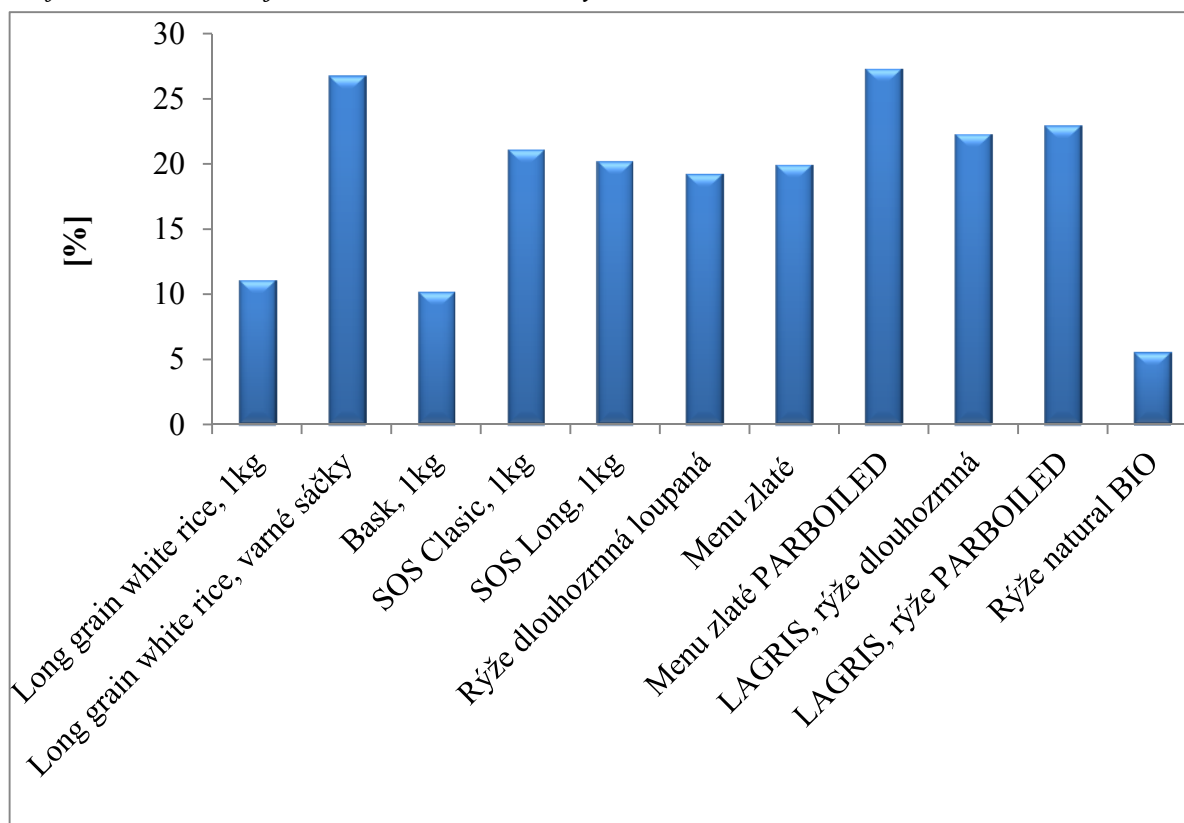
Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyiho-Nelsona bylo provedeno spektrofotometricky podle postupu v kap. 4.5. Každý vzorek byl proměřen třikrát proti slepému vzorku. Obsah celkových sacharidů byl vypočten z kalibrační rovnice

$A = 0,02018 \cdot c$. Obsah redukujících sacharidů byl přepočten na rozpustný podíl výrobku. Obsah redukujících sacharidů v rýži, obsah redukujících sacharidů v rozpustném podílu výrobku (RPV) a podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů v % je uveden v *tab. 13*. Obsah redukujících sacharidů v ostatních substrátech je uveden v *tab. 14*. Graficky znázorněný obsah redukujících sacharidů v rýži je v grafu 3 spolu s obsahem celkových sacharidů. V grafu 5 je graficky znázorněn podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů v %. V grafu 6 je graficky znázorněn obsah redukujících sacharidů u ostatních substrátů.

Tab. 13 Průměrný obsah redukujících sacharidů u jednotlivých vzorků rýže

Vzorek	Obsah (mg/100g výrobku)	Obsah (mg/100 g RPV)	Podíl RS z CS [%]
Long grain white rice, 1 kg	28,52 ± 0,36	299,61 ± 3,75	11,05
Long grain white rice, varné sáčky	47,01 ± 0,14	509,25 ± 1,53	26,72
Rýže Bask, 1 kg	28,98 ± 0,45	289,19 ± 4,51	10,15
SOS Clasic, 1 kg	53,96 ± 0,88	428,19 ± 7,01	21,07
SOS Long, 1 kg	36,82 ± 0,44	294,84 ± 3,51	20,17
Rýže dlouhozrnná loupaná	46,76 ± 0,48	478,78 ± 4,87	19,21
Menu zlaté	34,25 ± 1,70	438,46 ± 21,72	19,91
Menu zlaté Parboiled	194,07 ± 1,30	1 930,47 ± 12,96	27,28
Lagris, rýže dlouhozrnná	42,12 ± 0,48	405,01 ± 4,64	22,27
Lagris, rýže dlouhozrnná Parboiled	170,99 ± 2,98	1 564,58 ± 27,26	22,92
Rýže natural BIO	211,03 ± 3,10	2 120,90 ± 31,13	5,50

Graf 5: Podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů v %



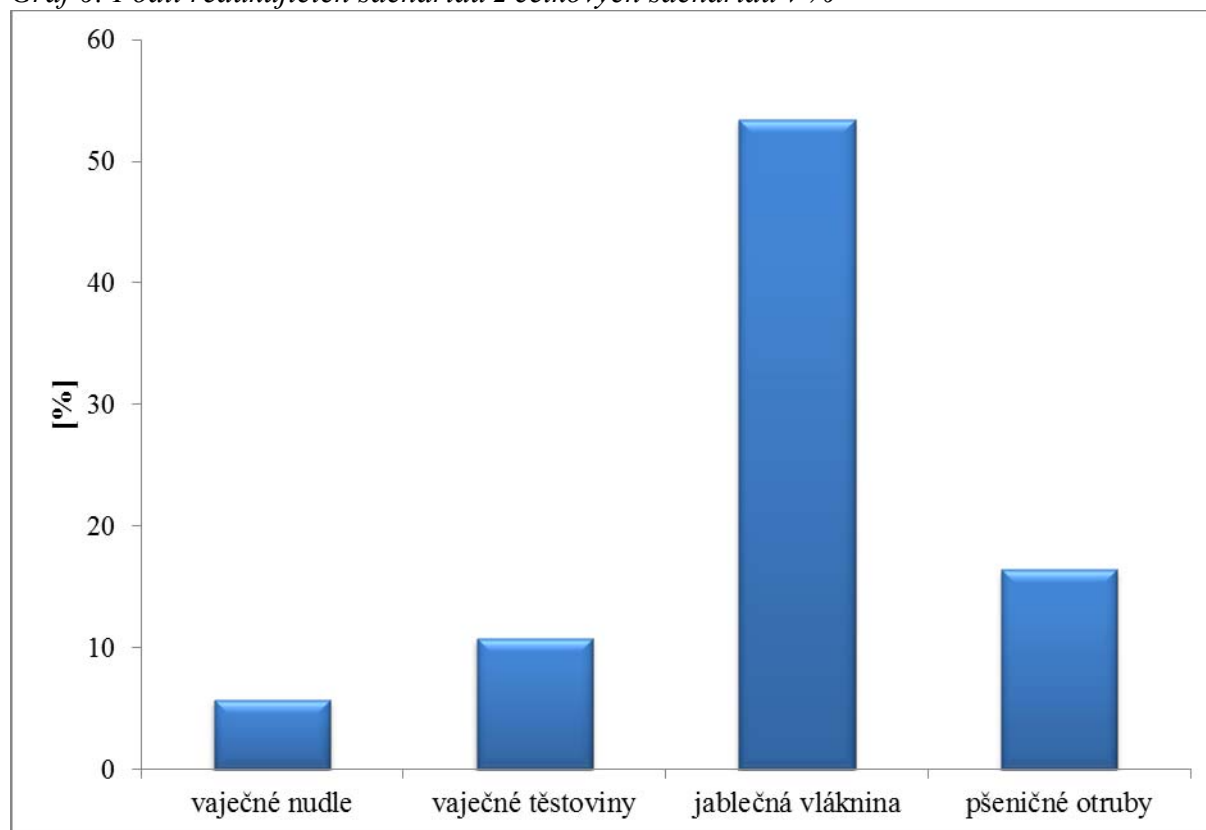
Průměrný obsah redukujících sacharidů přepočtený na 100 g rozpustného podílu výrobku se pohyboval v rozmezí od 289,19 mg/100 g RPV do 509,25 mg/100 g RPV. Výjimky tvořila Lagris, rýže dlouhozrnná PARBOILED s obsahem redukujících sacharidů 1564,58 mg/100 g RPV, Menu zlaté PARBOILED s obsahem 1930,47 mg/100 g RPV a Rýže natural BIO s obsahem redukujících sacharidů 2120,90 mg/100 g RPV.

Podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů se pohyboval v rozmezí od 5,50 % do 27,28 %. Největší podíl obsahovala rýže Menu zlaté PARBOILED o podílu 27,28 % spolu s rýží Long grain white rice ve varných sáčcích o podílu 26,72 %. Podíl 5,50 % obsahovala neloupaná rýže s názvem Rýže natural BIO. Snížený podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů obsahovala rýže Long grain white rice v 1 kg balení o podílu 11,05 % a rýže Bask v 1 kg balení o podílu 10, 15%. U ostatních rýží se obsahy pohybovaly okolo 20 %.

Tab. 14 Průměrný obsah redukujících sacharidů u ostatních substrátů

Vzorek	Obsah (mg/100 g výrobku)	Obsah (g/100 g RPV)	Podíl RS z CS [%]
Jablečná vláknina PROVITA	3 940,29 ± 27,06	13,79 ± 0,09	53,5
Vaječné nudle ANIREX	297,92 ± 6,79	1,61 ± 0,04	5,7
Pšeničné otruby EVIT	1 494,55 ± 27,08	4,76 ± 0,09	16,4
Vaječné těstoviny IDEAL	379,86 ± 6,69	2,17 ± 0,04	10,8

Graf 6: Podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů v %



Průměrný obsah redukujících sacharidů u ostatních substrátů přepočtený na 100 g RPV se pohyboval v rozmezí od 1,61 g/100 g RPV do 13,79 g/100 g RPV. Největší koncentrace

redukujících sacharidů byla zjištěna u jablečné vlákniny o průměrném obsahu 13,79 g/100 g výrobku. Nejmenší koncentrace byla zjištěna u vaječných nudlí.

Podíl redukujících sacharidů z celkových sacharidů byl u ostatních substrátů rozmanitý. Zatímco u jablečné vlákniny redukující sacharidy představovaly 53,5 %, u vaječných nudlí byl podíl redukujících sacharidů z celkových jen 5,7 %.

Hodnota redukujících sacharidů naznačuje využitelný podíl z celkových sacharidů, který je u většiny druhů rýže kolem 20%. Pokud srovnáme rýžový substrát s ostatními materiály, pšeničné otruby jsou srovnatelné s rýží a u jablečné vlákniny je více než 50% obsažených cukrů redukujících. Tomu odpovídají i předběžné výsledky kultivací mikroorganismů na jablečné vláknině, kdy byl pozorován intenzivní růst i produkce metabolitů. Vaječné těstoviny sice obsahují méně redukujících cukrů ale jsou zase vhodným doplňkovým zdrojem dusíku a obvykle jsou mikroorganismy dobře využívány.

5.5 Analýza redukujících sacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolyze

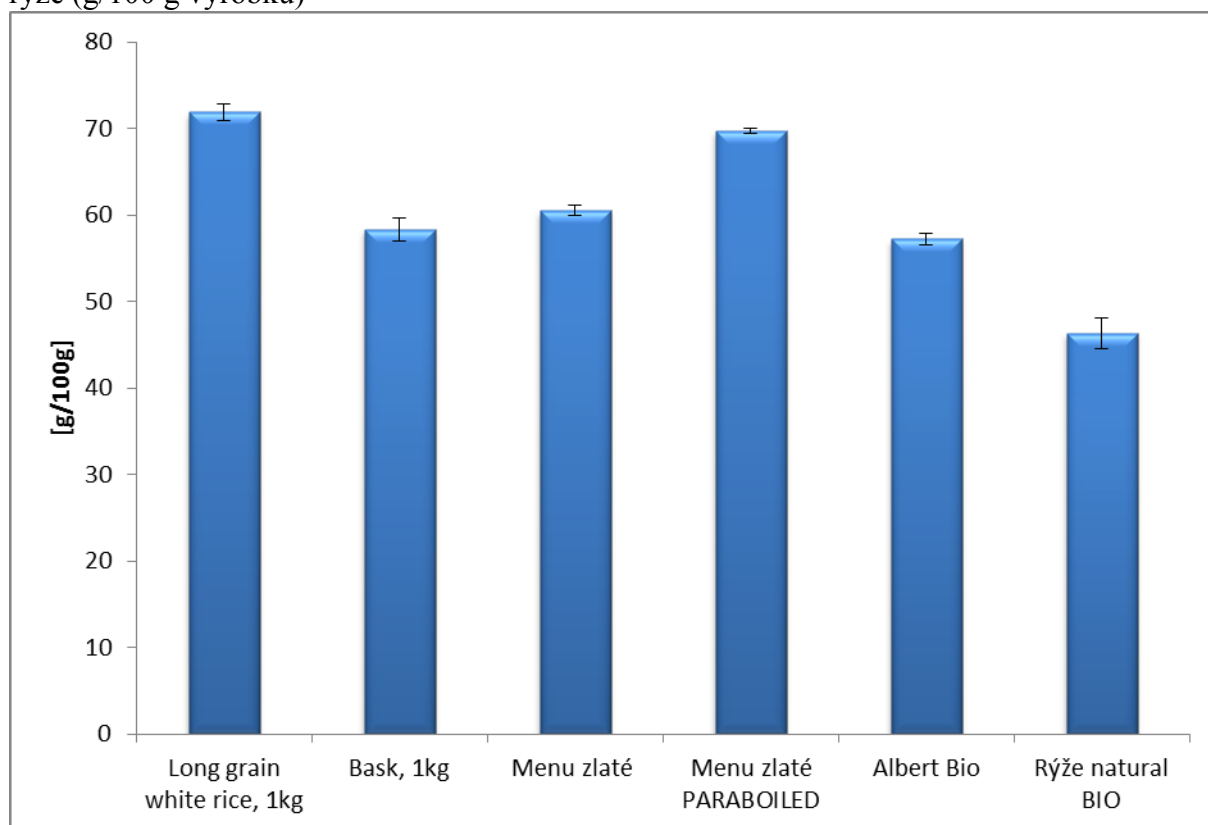
Byla provedena analýza redukujících sacharidů ve vzorcích rýže a v ostatních substrátech po kyselé hydrolyze pomocí metody popsané v kap. 4.6. Vzorky byly proměřeny spektrofotometricky. Každý vzorek byl proměřen třikrát proti slepému vzorku. Pomocí regresní rovnice $A = 0,02018 \cdot c$ byla naměřená absorbance přepočtena na koncentraci redukujících sacharidů ve vzorku.

Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolyze je uveden v *tab. 15* u rýží a v *tab. 16* u ostatních substrátů. Graficky znázorněný průměrný obsah redukujících sacharidů u rýží je vyobrazen v grafu 7 a u ostatních substrátů v grafu 8. Z výsledků je patrné, že hydrolyzou nerozpustných sacharidů vzrostl obsah redukujících cukrů na podstatně vyšší hodnoty.

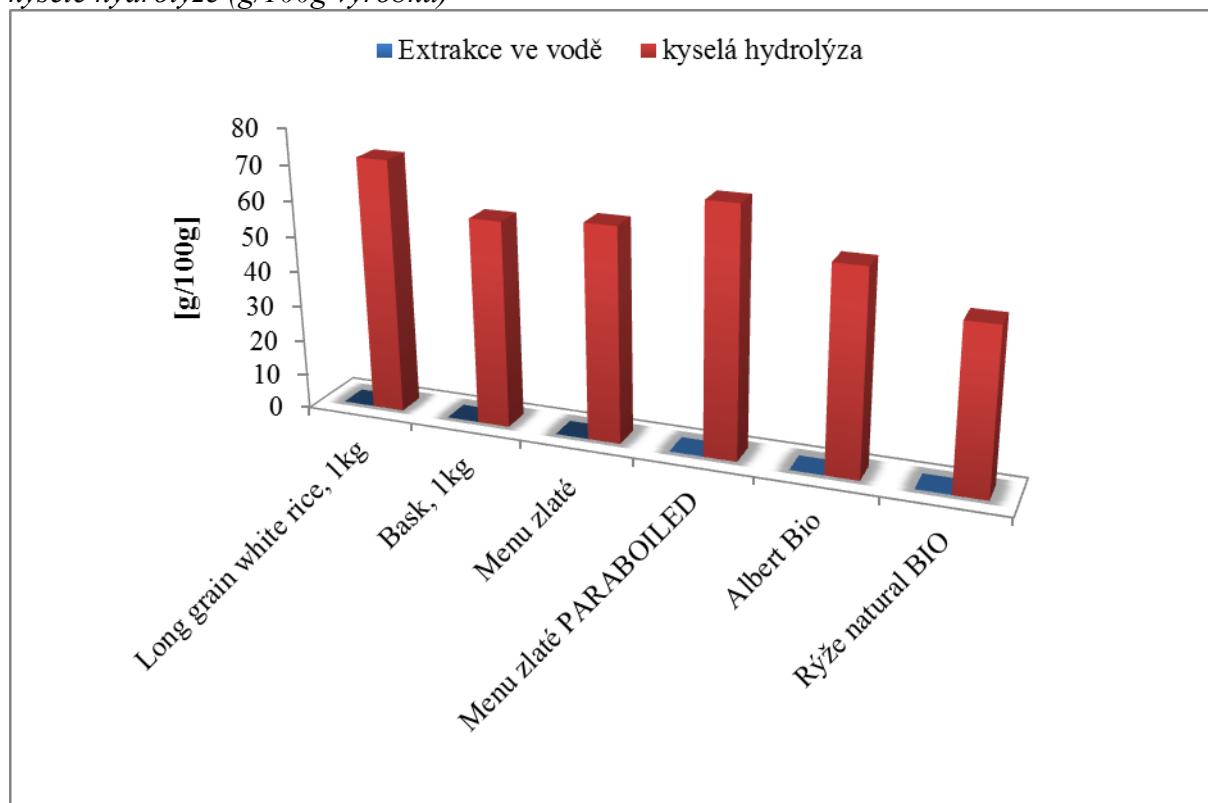
Tab. 15 Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolyze v jednotlivých druzích rýže (g/100 g výrobku)

Vzorek	Obsah (g/100 g výrobku)
Long grain white rice, 1 kg	71,89 ± 0,96
Bask, 1 kg	58,32 ± 1,28
Menu zlaté	60,52 ± 0,57
Menu zlaté Parboiled	69,72 ± 0,28
Albert Bio	57,23 ± 0,70
Rýže natural BIO	46,34 ± 1,75

Graf 7: Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze v jednotlivých druzích rýže (g/100 g výrobku)



Graf 8: Srovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků rýže ve vodě se vzorky rýže po kyselé hydrolýze (g/100g výrobku)



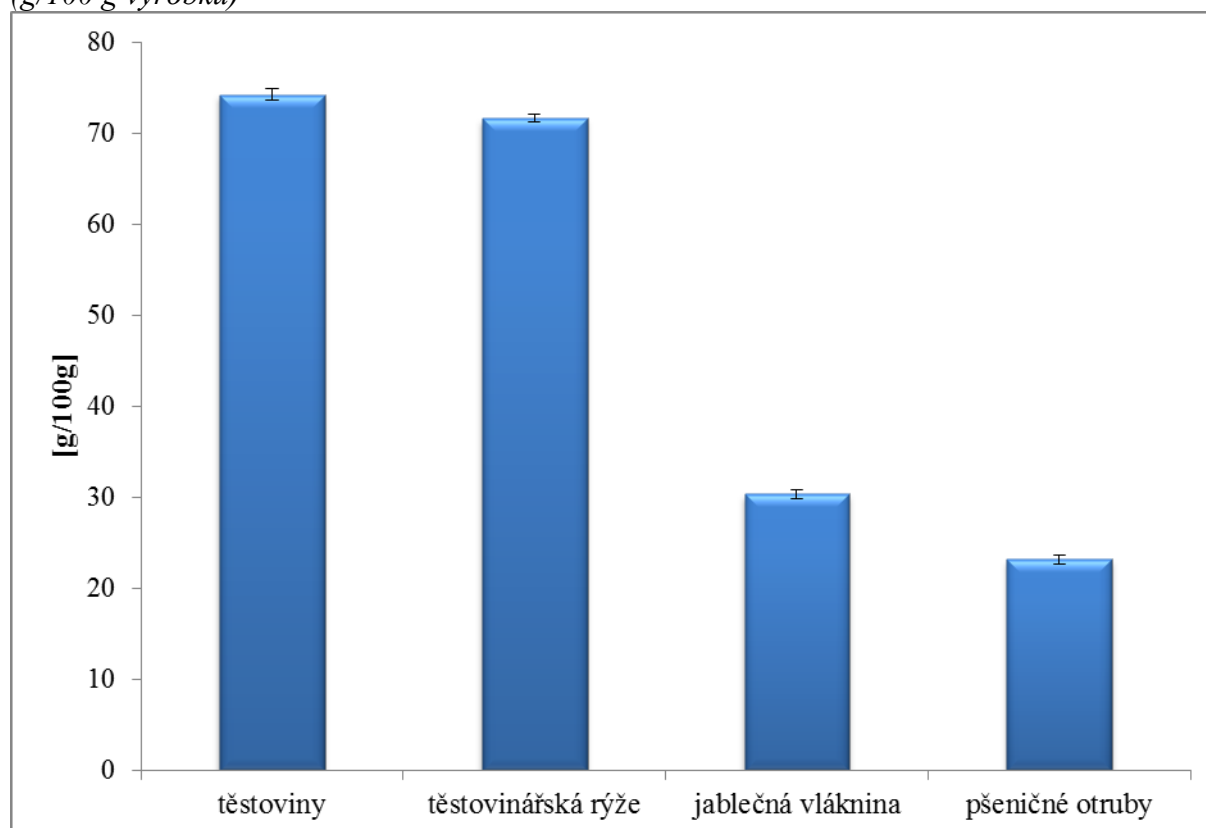
Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze se pohyboval v rozmezí od 46,34 g/100 g výrobku do 71,89 g/100 g výrobku.

Nejvyšší koncentrace redukujících sacharidů obsahovala rýže Long grain white rice v balení 1 kg s průměrným obsahem 71,89 g/100 g výrobku. Velmi blízko této hodnotě má rýže Menu zlaté PARBOILED s koncentrací 69,72 g/100 g výrobku. Rýže Menu zlaté nepodléhající technologii Parboiled měla průměrný obsah redukujících sacharidů o něco nižší, a to 60,52 g/100 g výrobku. V rýžích Bask 1 kg balení a rýže Albert Bio byl průměrný obsah redukujících sacharidů podobný. Nejmenší koncentraci redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze obsahovala neloupaná rýže s názvem Rýže natural BIO. V porovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků rýže ve vodě se vzorky po kyselé hydrolýze byl zjištěn rozdíl o tři řády. Kyselá hydrolýza působila na vzorky rýže velmi účinně.

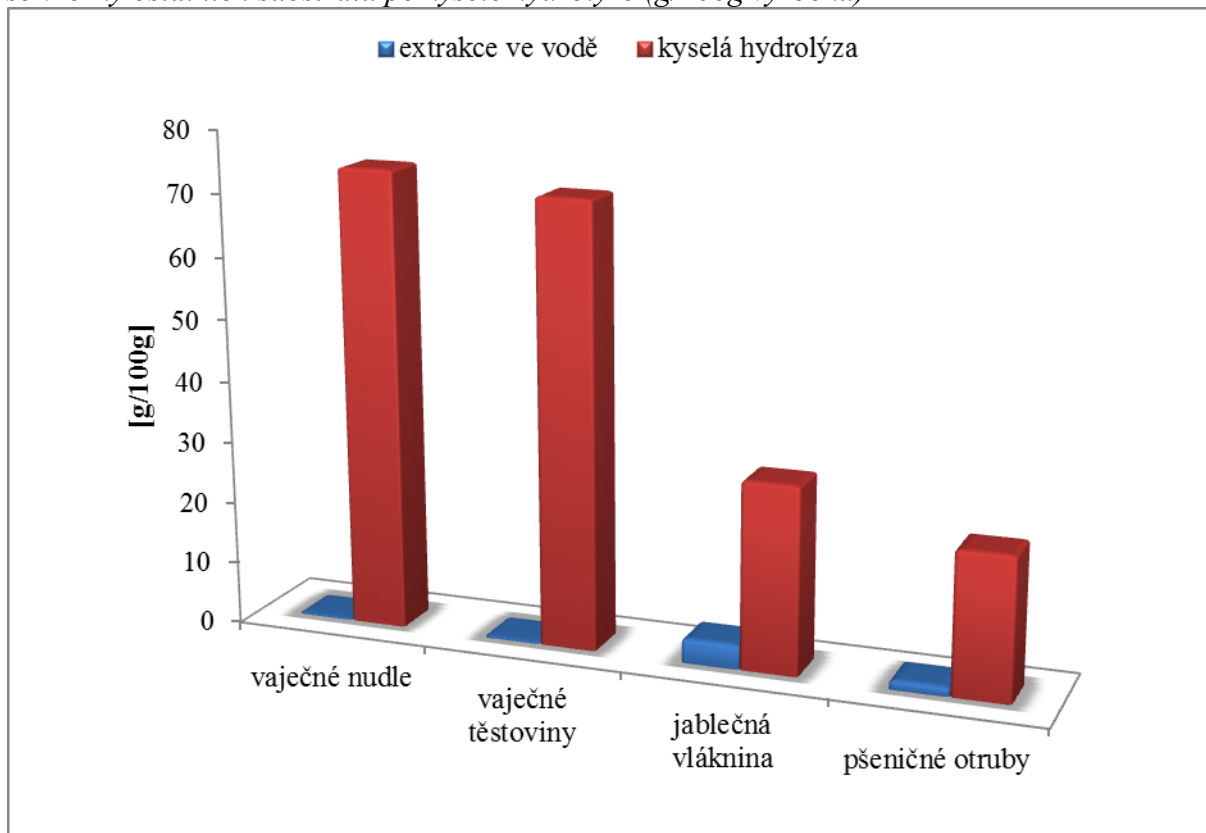
Tab. 16 Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze u ostatních substrátů (g/100 g výrobku)

Vzorek	Obsah (g/100 g výrobku)
Vaječné nudle	74,23 ± 0,67
Vaječné těstoviny	71,62 ± 0,46
Jablečná vláknina	30,33 ± 0,48
Pšeničné otruby	23,15 ± 0,45

Graf 9: Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze u ostatních substrátů (g/100 g výrobku)



Graf 10: Srovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků ostatních substrátů ve vodě se vzorky ostatních substrátů po kyselé hydrolýze (g/100g výrobku)



Průměrný obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze u ostatních substrátů se pohyboval v rozmezí od 74,23 g/100 g výrobku do 23,15 g/100 g výrobku. Nejvyšší koncentrace redukujících sacharidů byly zaznamenány u vaječných nudlí s obsahem 74,23 g/100 g výrobku a u vaječných těstovin s obsahem 71,62 g/100 g výrobku. Podstatně nižší průměrný obsah redukujících sacharidů obsahovala jablečná vláknina s koncentrací 30,33 g/100 g výrobku a pšeničné otruby s koncentrací 23,15 g/100 g výrobku. Při srovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků ostatních substrátů ve vodě s ostatními substráty po kyselé hydrolýze byl zjištěn rozdíl menší než u srovnání redukujících sacharidů u vzorků rýže. U ostatních substrátů byl rozdíl redukujících sacharidů o jeden řád.

5.6 Analýza sacharidů pomocí metody TLC

Analýza sacharidů metodou TLC byla provedena u neloupané rýže. Z retenčních faktorů a barev byly zjištěny sacharidy obsažené v neloupané rýži. V neloupané rýži byla detekována arabinosa, glukosa, sacharosa, maltosa a cellobiosa. Fotografie chromatogramu se nachází v příloze 5.

5.7 Analýza mono- a disacharidů ve vzorcích pomocí metody HPLC

Mono- a disacharidy byly stanoveny podle postupu v kap. 4.7. Obsah sacharidů byl stanoven u vybraných druhů rýže a u ostatních substrátů po extrakci ve vodě. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a z plochy píku byl stanoven průměrný obsah detekovaných sacharidů pomocí regresních rovnic jednotlivých sacharidů. Regresní rovnice byly použity z paralelně zpracovávané diplomové práce [37].

Tab. 17 Průměrný obsah monosacharidů u jednotlivých vzorků po extrakci ve vodě (mg/100 g substrátu)

Vzorky rýže	Arabinosa	Fruktosa	Glukosa
Long grain white rice, 1 kg	31,30 ± 0,93	nd	21,80 ± 0,41
Bask, 1 kg	7,16 ± 0,70	nd	4,55 ± 0,31
Menu zlaté	8,15 ± 0,76	nd	16,58 ± 0,47
Menu zlaté Parboiled	9,14 ± 0,61	nd	14,47 ± 0,53
Albert Bio	45,49 ± 0,74	nd	174,64 ± 6,80
Rýže natural BIO	53,92 ± 0,40	nd	252,40 ± 8,83
Vzorky ostatních substrátů			
Vaječné nudle	36,43 ± 0,61	nd	15,71 ± 0,69
Vaječné těstoviny	112,01 ± 0,86	nd	41,99 ± 1,71
Jablečná vláknina	671,20 ± 5,63	142,14 ± 1,93	1 765,9 ± 20,7
Pšeničné otruby	318,98 ± 3,33	178,68 ± 1,82	883,00 ± 34,18

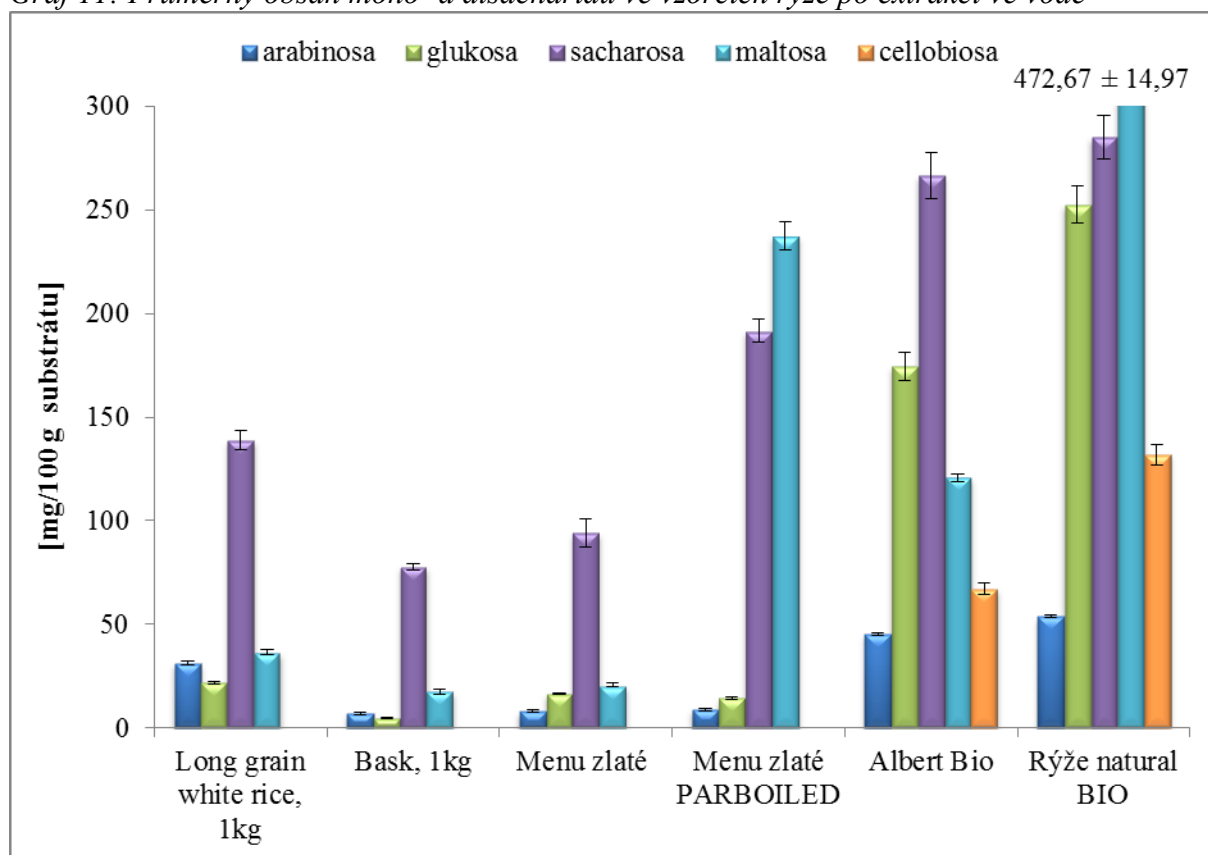
Pozn. nd = non detected (látky nebyly detekovány)

Tab. 18 Průměrný obsah disacharidů u jednotlivých vzorků po extrakci ve vodě (mg/100 g substrátu)

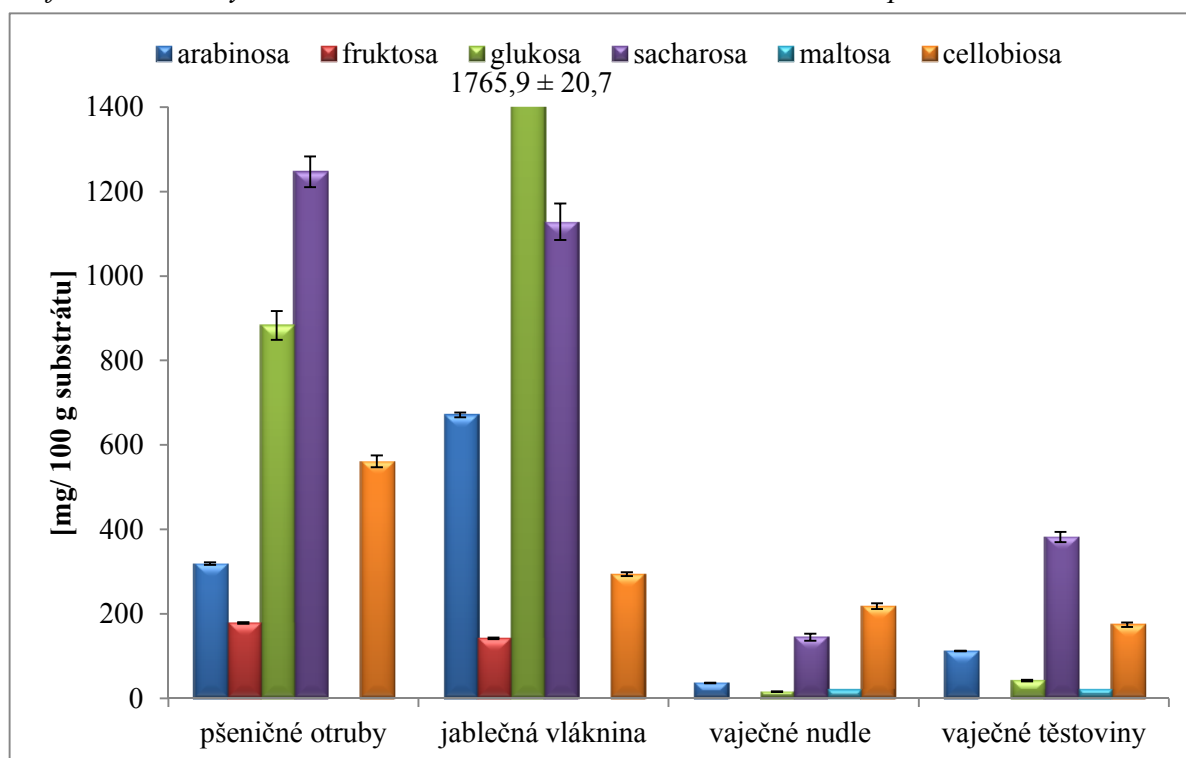
Vzorky rýže	Sacharosa	Maltosa	Cellobiosa
Long grain white rice, 1 kg	138,88 ± 4,91	36,41 ± 1,21	nd
Bask, 1 kg	77,82 ± 1,65	17,80 ± 1,22	nd
Menu zlaté	94,06 ± 6,67	20,63 ± 0,94	nd
Menu zlaté Parboiled	191,50 ± 5,56	237,49 ± 6,89	nd
Albert Bio	266,38 ± 10,92	120,91 ± 1,88	67,28 ± 2,91
Rýže natural BIO	284,93 ± 10,46	472,67 ± 14,97	132,06 ± 4,99
Vzorky ostatních substrátů			
Vaječné nudle	144,77 ± 8,24	18,92 ± 0,46	218,18 ± 6,95
Vaječné těstoviny	381,95 ± 11,87	20,23 ± 0,67	174,39 ± 5,07
Jablečná vláknina	1 128,3 ± 43,1	nd	293,76 ± 4,50
Pšeničné otruby	1 246,9 ± 36,6	nd	561,29 ± 13,79

Pozn. nd = non detected (látky nebyly detekovány)

Graf 11: Průměrný obsah mono- a disacharidů ve vzorcích rýže po extrakci ve vodě



Graf 12: Průměrný obsah mono- a disacharidů u ostatních substrátů po extrakci ve vodě



Arabinosa byla detekována ve všech proměřených vzorcích, její obsah se pohyboval v rozmezí od 7,16 mg/100 g rýže do 53,92 mg/100 g rýže, přičemž největší obsah arabinosy obsahovala neloupaná rýže značky Natural BIO. U ostatních substrátů se obsah arabinosy pohyboval ve vyšším množství, od 36,43 mg/100 g rýže do 671,20 mg/100 g substrátu. Nejvíce arabinosy obsahovala jablečná vláknina.

Fruktosa byla detekována ve dvou vzorcích z deseti, a to u jablečné vlákniny a pšeničných otrub. U jablečné vlákniny byl obsah fruktosy 142,14 mg/100 g substrátu, u pšeničných otrub 178,68 mg/100 g substrátu.

Dalším detekovaným monosacharidem byla glukosa, která byla detekována ve všech proměřených vzorcích. Ve vzorcích rýže se obsah glukosy pohyboval v rozmezí od 4,55 - 252,40 mg/100 g rýže. Nejvyšší množství bylo zjištěno u neloupané rýže značky Natural BIO. U ostatních substrátů byl obsah 15,71 - 1 765,9 mg/100 g vzorku, přičemž nejvyšší obsah byl u jablečné vlákniny.

Sacharosa byla detekována ve všech proměřených vzorcích. Obsah sacharosy u rýže se pohyboval od 77,82 mg/100 g rýže do 284,93 mg/100 g rýže. Největší obsah sacharosy obsahovala opět rýže neloupaná, podobné množství sacharosy obsahovala i rýže Albert Bio. Obsah sacharosy u ostatních substrátů byl 144,77 - 1 246,9 mg/100 g substrátu. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u pšeničných otrub, podobný obsah měla i jablečná vláknina.

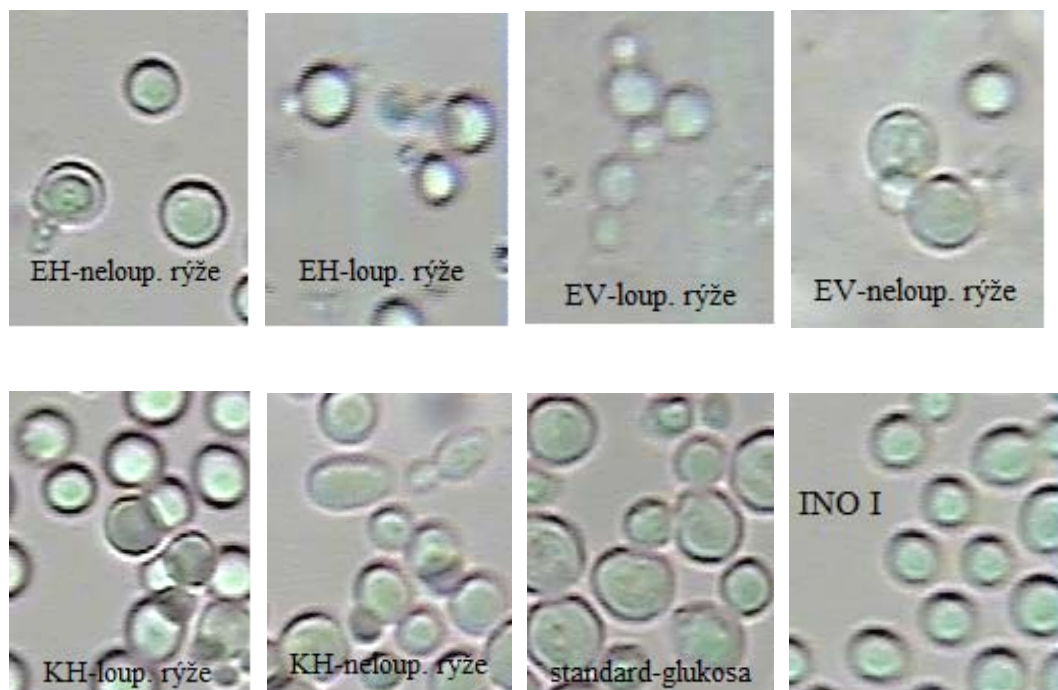
Maltosa byla zjištěna u osmi vzorků z deseti. Ve vzorcích rýže byl obsah 17,80 - 472,67 mg/100 g rýže. Největší množství obsahovala neloupaná rýže Natural BIO a rýže Menu zlaté Parboiled. U ostatních substrátů nebyla maltosa detekována u jablečné vlákniny a pšeničných otrub. U vaječných těstovin byl obsah maltosy 20,23 mg/ 100 g substrátu a u vaječných nudlí 18,92 mg/100 g substrátu. Vzorky rýže byly na maltosu mnohem bohatší, než ostatní proměřené substráty.

Cellobiosa byla naměřena u šesti vzorků z deseti proměřených. Ve vzorcích rýže byl obsah 67,28 - 132,06 mg/100 g rýže. Cellobiosa byla detekována u rýže Albert Bio v množství 67,28 mg/100 g rýže, u neloupané rýže, kde se cellobiosa nachází v obalových vrstvách, v množství 132,06 mg/100 g rýže. Obsah cellobiosy byl u ostatních substrátů vyšší než u vzorků rýže. Obsah cellobiosy se pohyboval v rozsahu 174,39 - 561,29 mg/100 g substrátu. Nejvyšší množství u ostatních substrátů bylo naměřeno u pšeničných otrub.

5.8 Charakterizace změn produkčních médií s rýžovým substrátem u kvasinky *Rhodotorula glutinis*

V dané kultivaci byly pozorovány v jednotlivých médiích charakteristiky kmene *Rhodotorula glutinis*. Substráty použité v médiích byly připraveny extrakcí loupané a neloupané rýže ve vodě, dále loupaná a neloupaná rýže podrobena kyselé a enzymové hydrolýze. Jako standard byla použita glukosa místo rýží.

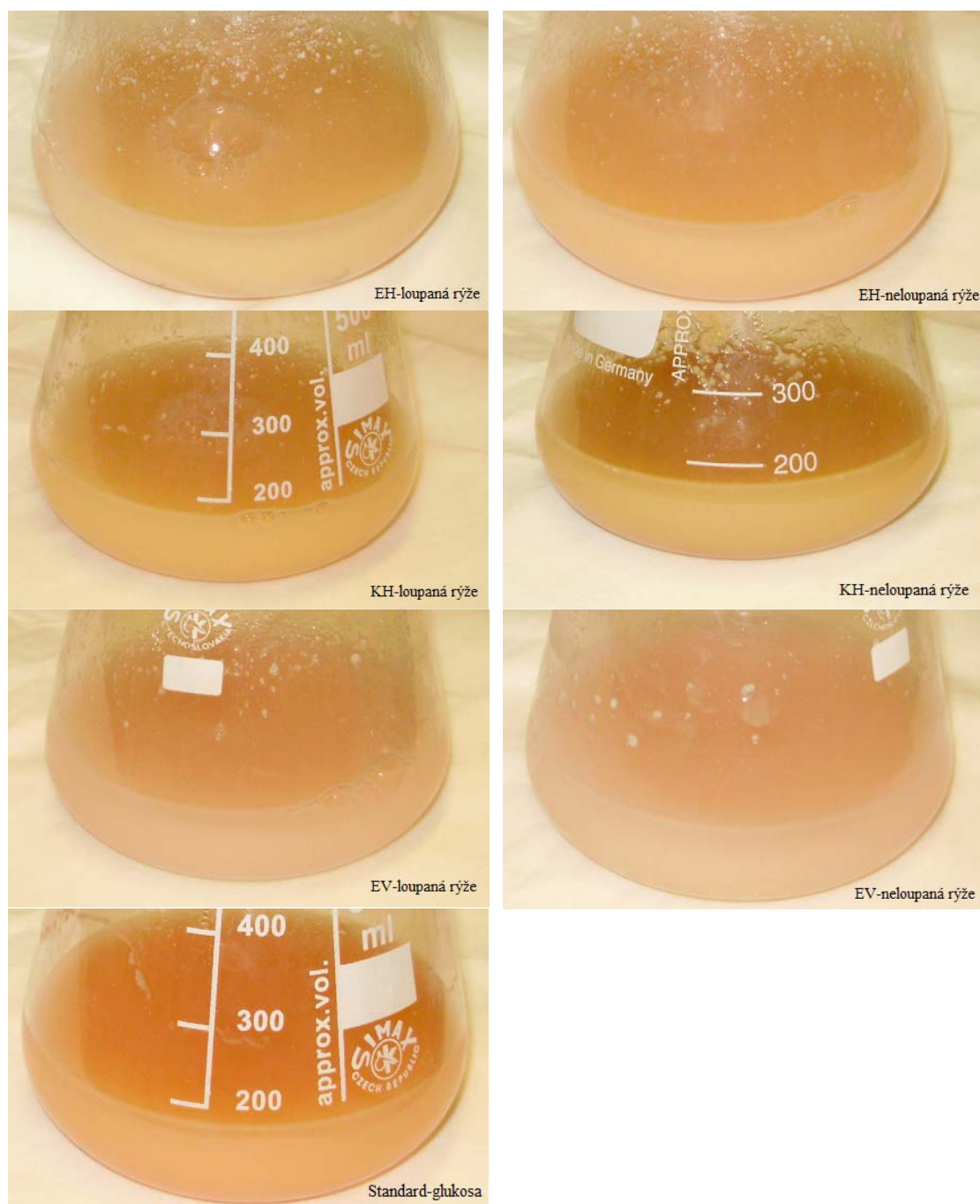
5.8.1 Pozorování morfologických změn u kvasinek pod mikroskopem



Obr. 9 Morfologie buněk u produkčních médií

Při mikroskopickém pozorování byly nalezeny morfologické zvláštnosti kvasinky *Rhodotorula glutinis* u některých z produkčních médií. V médiích, která byla podrobena enzymové hydrolýze, byly pozorovány nepoškozené buňky, ale také buňky poškozené, u nichž byly části buněk, resp. buněčná stěna výrazně poškozená. U médií, kde byla provedena extrakce substrátů ve vodě, byly pozorovány buňky různě zdeformované, mírně zploštělé. U médií, kde byl substrát podroben kyselé hydrolýze, byly pozorovány výrazné deformace, zploštělé buňky místo kulatých, byly objeveny i buňky s poškozenou buněčnou stěnou a buňky roztrhané. Velké množství buněk v těchto médiích bylo pod mikroskopem pozorováno jako mrtvé. V médiu, kde byla použita jako substrát glukosa, byly buňky mírně zdeformované. Tyto morfologické zvláštnosti mohou být zapříčiněny stresovými faktory obsaženými v substrátu. U kyselé hydrolýzy mohly deformaci a různé morfologické zvláštnosti způsobovat chemikálie při kyselé hydrolýze substrátu. Ideální tvar kvasinek byl pozorován v ino I, kde buňky měly kulatý tvar bez jakékoliv deformace a poškození buněčné stěny.

5.8.2 Pozorování zabarvení u produkčních médií



Obr. 10 Zabarvení u různých produkčních médií

Při kultivaci produkčních médií kvasinkou *Rhodotorula glutinis* došlo k barevným změnám médií. U médií došlo k oranžovo-růžovému zbarvení. U médií, kde proběhla enzymatická hydrolýza substrátu byla pozorována oranžová barva, což je znamení většího růstu kvasinky. Více oranžové bylo médium se substrátem neloupané rýže po enzymové hydrolýze než médium se substrátem loupané rýže. U médií, kde byl substrát podroben kyselé hydrolýze, můžeme pozorovat tmavě oranžové zbarvení média. Tmavě oranžové zbarvení je důsledkem dobrého růstu kvasinky, ovšem toto zbarvení je ovlivněno barvou kapaliny po kyselé hydrolýze, která byla také oranžová. U substrátů, které byly extrahovány ve vodě, bylo zbarvení média narůžovělé. Média s neloupanou a loupanou rýží byly zbarvené totožně. Zde byl růst kvasinky výrazně nižší díky malé koncentraci jednoduchých sacharidů. Oranžovo-červenou barvu obsahovalo médium, kde byl jako substrát glukosa.

5.8.3 Analýza redukujících sacharidů v produkčních médiích

Za účelem zjištění snížení obsahu redukujících sacharidů po kultivaci byla provedena analýza redukujících sacharidů v produkčních médiích. Ještě v nezaočkovaných médiích byly stanoveny redukující sacharidy po sterilaci u substrátů po kyselé hydrolýze a u substrátů po extrakci ve vodě. U substrátu, které byly podrobeny enzymové hydrolýze byly zjištěny redukující sacharidy po 1. sterilaci, po enzymové hydrolýze a po 2. sterilaci. Po 80 hodinách kultivace byly zjištěny redukující sacharidy ve všech produkčních médiích. Na základě těchto hodnot byly zkonstruovány tabulky a grafy.

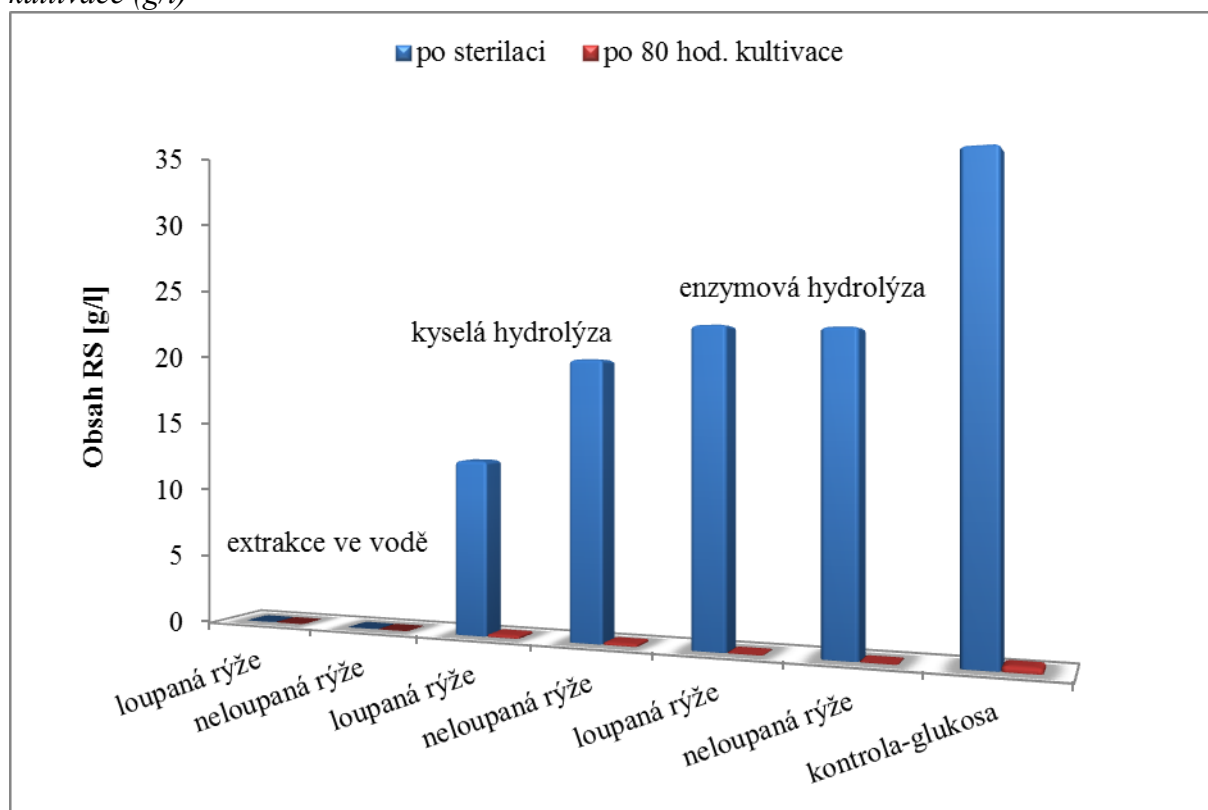
Tab. 19 Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů po sterilaci a po 80 hodinách kultivace

Substrát	Po sterilaci [mg/l]	Po 80 hod. kultivace [mg/l]
Extrakce ve vodě		
Loupaná rýže	11,45 ± 0,28	8,42 ± 0,12
Neloupaná rýže	11,12 ± 0,34	8,69 ± 0,12
Kyselé hydrolýza		
Loupaná rýže	12,55 ± 0,19	203,25 ± 1,62
Neloupaná rýže	19,76 ± 0,28	186,07 ± 0,92
Kontrola-glukosa	33,05 ± 0,08	408,16 ± 4,72

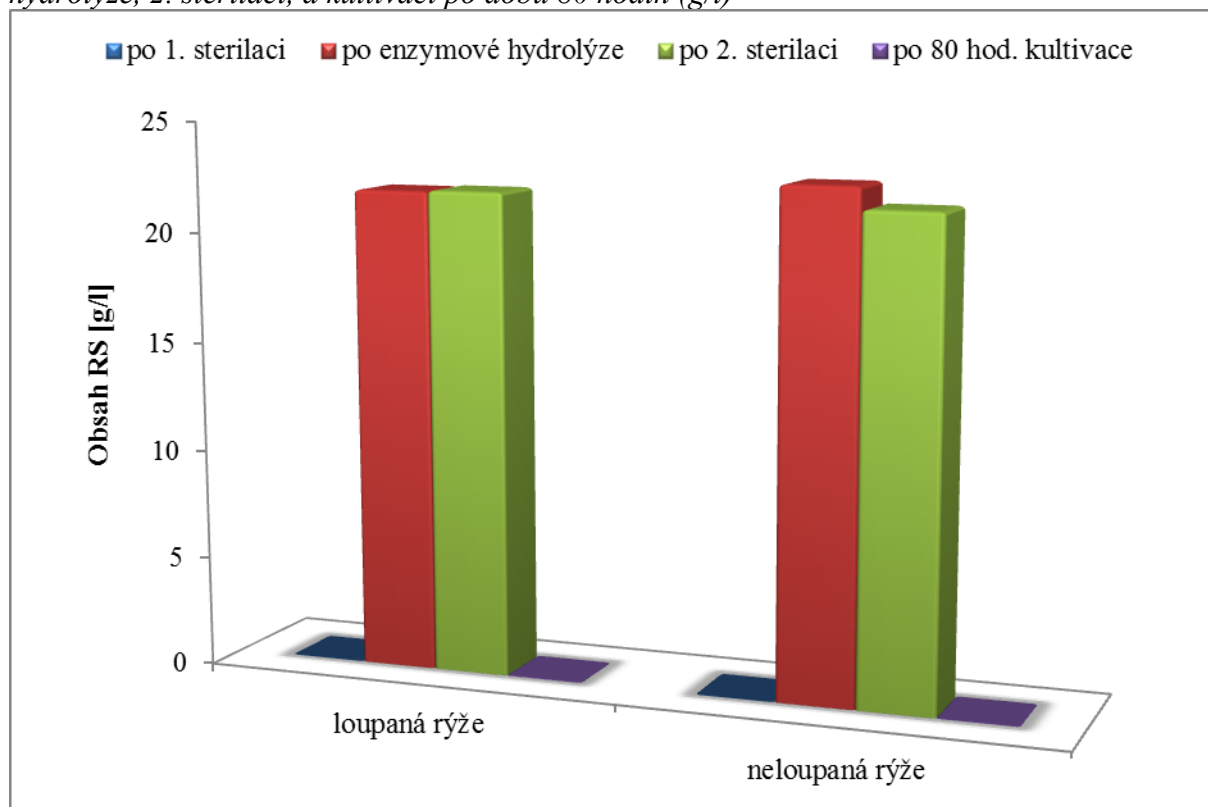
Tab. 20 Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů po 1. sterilaci, po enzymové hydrolýze, po 2. sterilaci a po 80 hodinách kultivace

Substrát	Po 1. sterilaci [mg/l]	Po enzymové hydrolýze [g/l]	Po 2. sterilaci [g/l]	Po 80 hod. kultivace [mg/l]
Loupaná rýže	8,31 ± 0,15	21,97 ± 0,29	22,02 ± 0,43	22,89 ± 0,57
Neloupaná rýže	8,97 ± 0,33	22,73 ± 0,16	21,75 ± 0,11	22,23 ± 0,69

Graf 13: Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů po sterilaci a po 80 hodinách kultivace (g/l)



Graf 14: Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů podrobených 1. sterilaci, kyselé hydrolyze, 2. sterilaci, a kultivaci po dobu 80 hodin (g/l)



Průměrná koncentrace redukujících sacharidů po sterilaci u extrakce ve vodě byla výrazně nižší než průměrná koncentrace redukujících sacharidů u médií, které byly podrobeny kyselé a enzymové hydrolýze. Obsah redukujících sacharidů byl u neloupané rýže po extrakci ve vodě a po sterilaci 11,12 mg/l, u loupané rýže 11,45 mg/l. Po 80 hodinách kultivace koncentrace redukujících sacharidů klesla u neloupané rýže na 8,69 mg/l, u loupané rýže na 8,42 mg/l. Růst kvasinky *Rhodotorula glutinis* byl malý díky nízkému obsahu jednoduchých cukrů a vysokému obsahu cukrů složitých. Loupaná rýže, která byla podrobena kyselé hydrolýze měla koncentraci redukujících sacharidů po sterilaci 12,55 g/l, u neloupané rýže byla koncentrace redukujících sacharidů 19,76 g/l. Po 80 hodinách kultivace byla průměrná koncentrace redukujících sacharidů u loupané rýže 203,3 mg/l, u neloupané 186,1 mg/l. U těchto substrátů byl růst kvasinky znatelně vyšší, než u substrátů extrahovaných ve vodě. Použitím kyselé hydrolýzy bylo způsobeno rozštěpení složitých cukrů a tím došlo k vysokému nárůstu obsahu redukujících sacharidů, které jsou příznivé pro lepší růst kvasinky.

U substrátů po enzymové hydrolýze a po 2. sterilaci byla koncentrace redukujících sacharidů nejvyšší ze všech tří zkoušených metod. Enzymová hydrolýza byla na štěpení glykosidických vazeb u sacharidů nejúčinnější. U těchto substrátů po 80 hodinách kultivace byl úbytek redukujících sacharidů největší oproti ostatním substrátům s výjimkou kontroly - glukosy. Po enzymové hydrolýze byla koncentrace redukujících sacharidů u loupané rýže 21,97 g/l, u rýže neloupané 22,73 g/l. Po 2. sterilaci se koncentrace výrazně nezměnila. Nepřesnosti mezi hodnotami po enzymové hydrolýze a po 2. sterilaci byly spíše způsobeny chybou měření. Po 80 hodinách kultivace koncentrace redukujících sacharidů výrazně klesla. Koncentrace u loupané rýže byla 22,89 mg/l, u neloupané 22,23 mg/l.

Největší úbytek byl zaznamenán u média, kde jako zdroj uhlíku byla použita glukosa. Koncentrace glukosy po sterilaci byla 33,05 g/l, po 80 hodinách kultivace koncentrace glukosy v médiu klesla na 408,2 mg/l. Glukóza je tedy nejlépe využitelným substrátem kvasinkou *R. glutinis*.

U neloupané rýže byl předchozím měřením zjištěn výrazně vyšší obsah redukujících sacharidů než u rýže loupané. Při extrakci ve vodě nedošlo k úplné extrakci redukujících sacharidů u neloupané rýže, proto byla s loupanou rýží téměř srovnatelná. Úbytek koncentrace redukujících sacharidů byl po kultivaci velmi podobný. Po enzymové hydrolýze došlo k velmi účinnému narušení glykosidických vazeb a vzniku jednoduchých cukrů. I v tomto případě byly rýže srovnatelné. Největší rozdíl nastal po kyselé hydrolýze, kde koncentrace redukujících sacharidů u neloupané rýže byla o jednu třetinu větší než u rýže loupané. Kvasinka *Rhodotorula glutinis* využila velmi efektivně tyto připravené substráty.

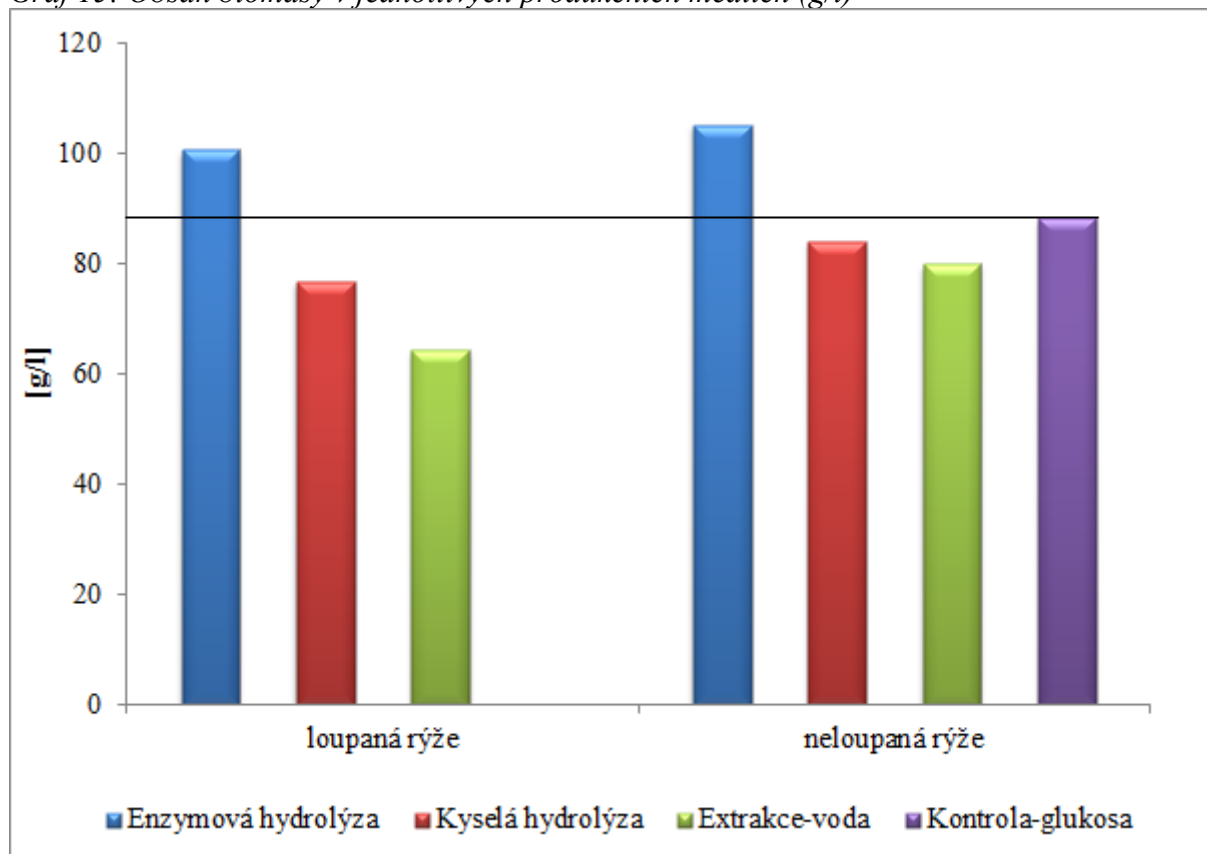
5.8.4 Stanovení biomasy *R. glutinis* v produkčních médiích

V jednotlivých produkčních médiích byla změřena biomasa spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 630$ nm proti čistému produkčnímu médiu. 1 ml vzorku byl naředěn tak, aby absorbance byla v rozsahu spektrofotometru. Přepočet absorbance na obsah biomasy v g/l byl proveden pomocí rovnice regrese $A = 0,1974 \cdot c - 0,0234$ [38, 39].

Tab. 21 Obsah biomasy v jednotlivých produkčních médiích

Substrát	Extrakce ve vodě [g/l]	Enzymová hydrolýza [g/l]	Kyselá hydrolýza [g/l]
Loupaná rýže	64,2	100,6	76,9
Neloupaná rýže	79,9	105,1	84,1
Kontrola-glukosa	88,3		

Graf 15: Obsah biomasy v jednotlivých produkčních médiích (g/l)



Nejvyšší obsah biomasy byl sledován u enzymově hydrolyzovaných médií, kde obsah u loupané rýže byl 100,6 g/l a u neloupané 105,1 g/l. Obsah biomasy u enzymové hydrolýzy byl větší, než obsah biomasy u kontroly - glukosy. Tento zvýšený obsah mohl být způsoben pozitivními stresy působícími na kvasinku v produkčních médiích. V produkčních médiích u enzymové hydrolýzy mohou být tedy látky pozitivně ovlivňující růst kvasinky *Rhodotorula glutinis*. U produkčních médií, které byly podrobeny kyselé hydrolýze, byl obsah biomasy nižší než u kontroly. Obsah biomasy u loupané rýže po kyselé hydrolýze byl 64,2 g/l, u neloupané 79,9 g/l. Nejméně biomasy obsahovala produkční média, kde byl substrát extrahován ve vodě. U médií podrobených kyselé hydrolýze a u médií podrobených extrakci ve vodě mohl být růst kvasinek menší kvůli negativním stresovým faktorům. U kyselé hydrolýzy mohly být stresovými faktory chemikálie, které byly použity na kyselou hydrolýzu. U substrátů extrahovaných ve vodě byly kvasinky nuceny metabolizovat i jiné cukry, než cukry redukující. Nárůst biomasy u substrátů extrahovaných ve vodě byl velký i přesto, že koncentrace a úbytek redukujících sacharidů byla nízká oproti ostatním médiím.

5.9 Charakterizace produkčních médií u bakterie *Bacillus subtilis*

Produkční média po přidání substrátu, v našem případě rýže loupané, neloupané a standardu glukosy, byla mírně zakalená. Po 30 hodinách kultivace byl zákal výraznější, což bylo projevem růstu bakterie na těchto produkčních médiích. Morfologie buněk byla u všech produkčních médií stejná, morfologické zvláštnosti nebyly zpozorovány.



Obr. 11 *Bacillus subtilis* v produkčním médiu

Buňky bakterie rodu *Bacillus*, kam se řadí *Bacillus subtilis*, jsou tvaru rovných tyčinek různé délky, často uspořádaných ve dvojicích nebo v řetězcích se zakulacenými nebo čtvercovými konci. Pohybují se pomocí peritrichálních bičků. Endospory jsou oválné nebo kulaté a jsou velmi rezistentní k mnoha nepříznivým podmínkám [40].

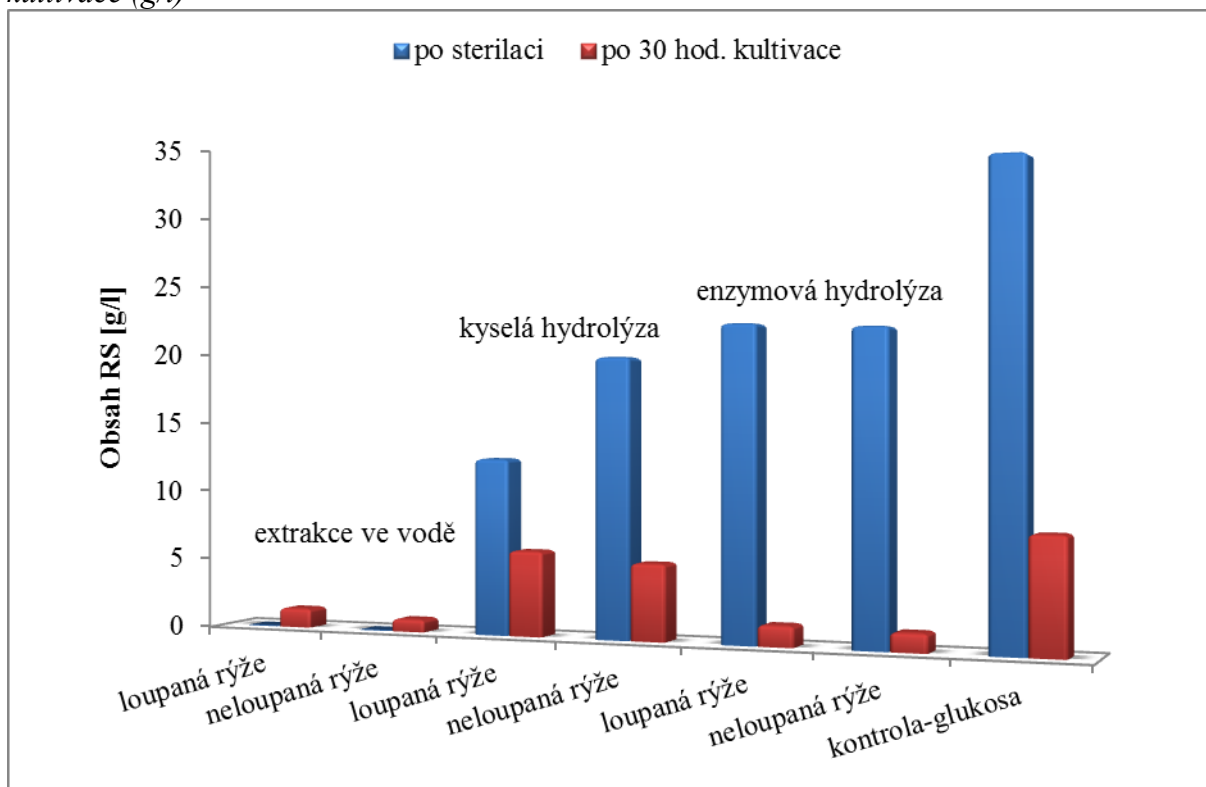
5.9.1 Analýza redukujících sacharidů v produkčních médiích *B.subtilis*

Byla provedena analýza redukujících sacharidů u jednotlivých produkčních médií po 30 hodinách kultivace. Hodnoty redukujících sacharidů po sterilacích, po enzymové a kyselé hydrolýze byly použity z analýzy redukujících sacharidů produkčních médií u kvasinek. Tyto hodnoty jsou uvedeny v kap. 5.8.3, v tabulkách 19 a 20. Průměrná koncentrace redukujících sacharidů v produkčních médiích po 30 hodinách kultivace jsou uvedeny v tab. 22.

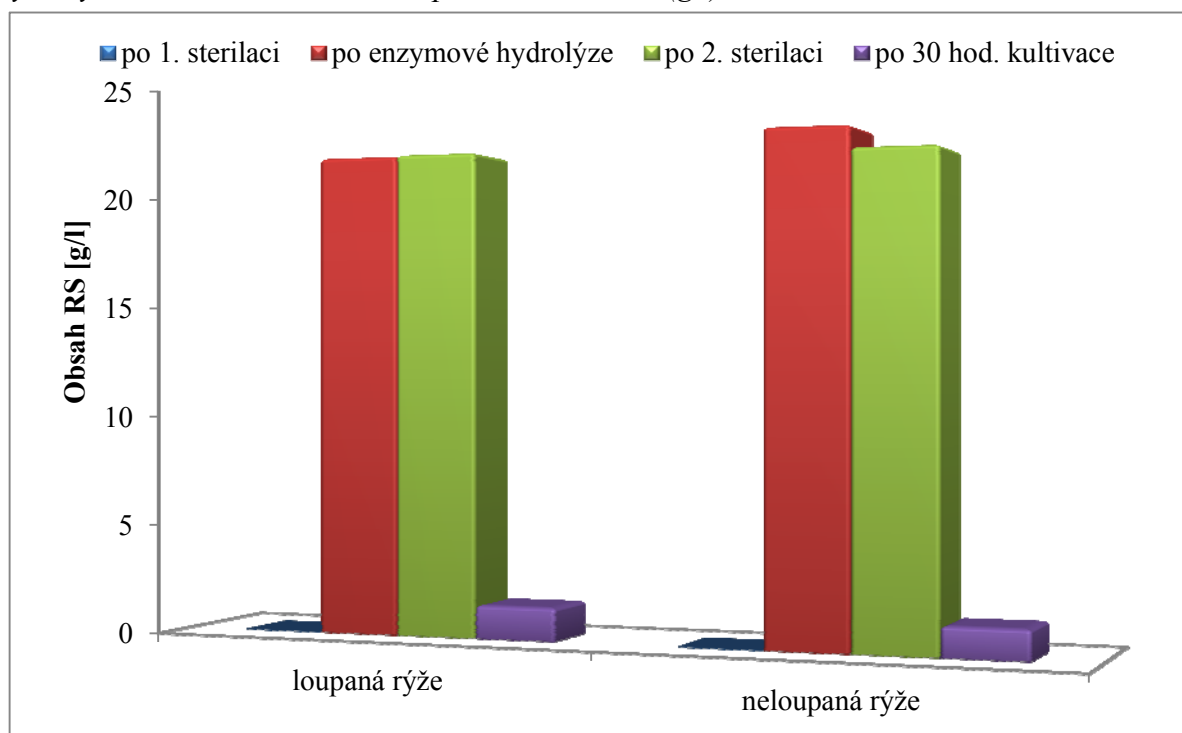
Tab. 22 Průměrný obsah redukujících sacharidů po 30 hodinách kultivace

Substrát	Enzymová hydrolýza [g/l]	Kyselé hydrolýza [g/l]	Extrakce ve vodě [g/l]
Loupaná rýže	1,52 ± 0,01	6,08 ± 0,08	1,40 ± 0,01
Neloupaná rýže	1,37 ± 0,01	5,44 ± 0,06	0,93 ± 0,01
Kontrola-glukosa			8,10 ± 0,05

Graf 16: Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů po sterilaci a po 30 hodinách kultivace (g/l)



Graf 17: Průměrný obsah redukujících sacharidů u substrátů podrobených 1. sterilaci, kyselé hydrolyze, 2. sterilaci, a kultivaci po dobu 30 hodin (g/l)



V produkčních médiích extrahovaných ve vodě a po 30 hodinách kultivace byl pozorován nárůst koncentrace redukujících sacharidů z původních 11,45 mg/l na 1,52 g/l u loupané rýže, u neloupané rýže koncentrace z původních 11,12 mg/l na konečných 1,37 g/l. Tento nárůst koncentrace redukujících sacharidů byl způsoben extracelulárními amylolytickými enzymy bakterie *Bacillus subtilis*. V těchto produkčních médiích byl malý podíl jednoduchých sacharidů, proto mohla být produkce extracelulárních enzymů vyšší než u ostatních substrátů, které byly podrobeny hydrolýzám a tím došlo k rozštěpení glykosidických vazeb u sacharidů a nárůstu koncentrace redukujících sacharidů.

U loupané rýže, která byla podrobená kyselé hydrolýze došlo k menšímu úbytku po 30 hodinách kultivace, než u rýže neloupané. U neloupané rýže byla koncentrace redukujících sacharidů po sterilaci vyšší než u loupané rýže, ale po 30 hodinách kultivace byl obsah redukujících sacharidů u neloupané rýže nižší než u loupané rýže. Velký úbytek koncentrace redukujících sacharidů byl objeven u enzymové hydrolýzy jak loupané tak neloupané rýže. U neloupané rýže podrobené enzymové hydrolýze a po 30 hodinách kultivace byl úbytek redukujících sacharidů větší než u loupané rýže podrobené kyselé hydrolýze. Největší úbytek redukujících sacharidů byl u kontroly-glukosy. Ovšem tento úbytek není směrodatný, bakterie jsou schopny metabolizovat i jiné cukry než redukující. V rýži je obsaženo i určité množství neredukujících sacharidů, které mohly ke svému růstu a rozmnožování použít.

5.9.2 Stanovení biomasy Bakterie *B.subtilis* v produkčních médiích

Stanovení biomasy u bakterie bylo provedeno shodně se stanovením biomasy v produkčních médiích u kvasinek v kap. 5.8.4. Přepočet absorbance na obsah biomasy v g/l byl proveden pomocí rovnice regrese $A = 4,1772 \cdot c$ [41].

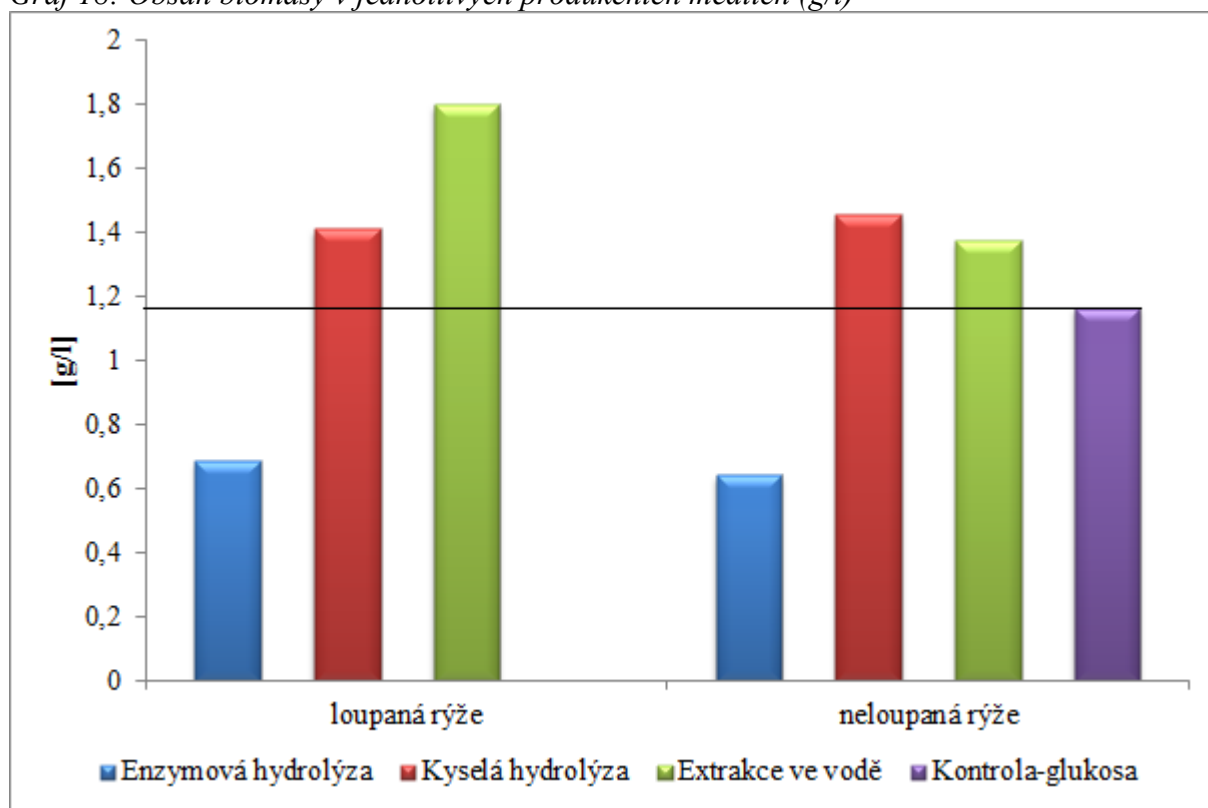
Tab. 23 Obsah biomasy v jednotlivých produkčních médiích

Substrát	Extrakce ve vodě [g/l]	Enzymová hydrolýza [g/l]	Kyselé hydrolýza [g/l]
Loupaná rýže	1,80	0,68	1,41
Neloupaná rýže	1,37	0,64	1,46
Kontrola-glukosa	1,16		

V grafu 18 (viz níže) je znázorněn obsah biomasy v jednotlivých médiích. Největší nárůst biomasy byl pozorován u substrátů, které byly extrahovány ve vodě. Výrazně vyšší nárůst byl u loupané rýže oproti rýži neloupané. U substrátů podrobených kyselé hydrolýze byl nárůst větší, než nárůst biomasy u kontroly-glukosy. Tento jev byl pozorován i u substrátů, které byly extrahovány ve vodě. U těchto substrátů mohly být látky, které pozitivně působí na růst bakterie v tomto prostředí. Nejmenší množství biomasy bylo naměřeno u substrátů, které byly podrobeny enzymové hydrolýze. Vliv na růst v produkčních médiích mohl mít osmotický tlak. U enzymové hydrolýzy byl nárůst biomasy nižší, protože sacharidy zvyšují osmotický tlak v médiu, což může být projevem malého nárůstu biomasy. Dalším problémem mohl být samotný zákal médií. Po enzymové hydrolýze bylo médium čířejší díky rozkladu rýže pomocí enzymů a tím i tedy menší absorbance. Po kyselé hydrolýze byl roztok zbarvený oranžovo-hnědě. Díky tomu mohla být absorbance zkreslena a ve výsledku vychází vyšší naměřené množství biomasy. U médií, které byly extrahovány ve vodě byla barva tmavší, než po

enzymatické hydrolyze. I toto mohlo způsobit vyšší absorbanci a tím větší naměřené množství biomasy.

Graf 18: Obsah biomasy v jednotlivých produkčních médiích (g/l)



6 ZÁVĚR

Předložená práce byla zaměřena přednostně na analýzu sacharidů a jejich změny u rýžových substrátů v průběhu různých typů extrakčních postupů s následným využitím zpracovaných substrátů jako složek média pro kultivaci modelových průmyslových organismů. Byl analyzován obsah glykosidů a dále celkových a redukujících sacharidů podle daných spektrofotometrických metod u vzorků rýže a u ostatních substrátů, které byly extrahovány ve vodě nebo podrobeny kyselé hydrolýze. Pomocí metody HPLC/RI byl zjištěn obsah mono- a disacharidů u vzorků rýže a u ostatních substrátů extrahovaných ve vodě. Na vybraných druzích rýže byla provedena kultivace mikroorganismy, kde rýže byla před kultivací upravena chemickou nebo enzymovou hydrolýzou a poté analyzována na obsah redukujících sacharidů. V substrátech bylo měřeno množství biomasy.

Při stanovení celkových polyfenolů u vzorků rýže se hodnoty pohybovaly mezi 17,09 - 55,96 mg/100 g rýže. Nejvyšší množství obsahovala rýže neloupaná Natural BIO s obsahem 55,96 mg/100 g rýže, kde je značné množství celkových polyfenolů obsaženo v obalových vrstvách. Nejmenší množství celkových polyfenolů obsahovala rýže Long grain white rice. V porovnání rýží Menu zlaté a Menu zlaté Parboiled, kde Menu zlaté Parboiled byla podrobena hydrotermické úpravě, je obsah celkových polyfenolů u této rýže mírně vyšší. Obsah celkových flavonoidů se pohyboval v rozmezí od 2,45 do 8,13 mg/100 g rýže. Nejvyšší obsah celkových flavonoidů obsahovala neloupaná rýže Natural BIO s obsahem 8,13 mg/100 g rýže. Nejmenší množství celkových flavonoidů obsahovala rýže Long grain white rice. Při srovnání rýže Menu zlaté a Menu zlaté Parboiled docházíme k výsledku, že rýže po hydrotermické úpravě obsahuje větší množství celkových flavonoidů. Podíl celkových flavonoidů z celkových polyfenolů se pohyboval v rozmezí od 14,32 do 25,43 %. Stanovení polyfenolických látek bylo doplňkovou analýzou k posouzení obsahu glykosidů.

Koncentrace celkových sacharidů byla u vzorků rýže 1,46 - 7,08 g/100 g rozpustného podílu výrobku. Výjimku zde tvořila neloupaná rýže Natural BIO, která obsahovala 38,58 g/100 g RPV. Vyšší koncentraci obsahovala rýže Menu zlaté Parboiled, nejnižší obsah byl naměřen u rýže SOS Long. Ostatní rýže měly obsah celkových sacharidů velmi podobný. Koncentrace celkových sacharidů u ostatních substrátů byla výrazně vyšší než u vzorků rýže. Obsah celkových sacharidů u ostatních substrátů byl 20,04 - 28,95 g/100 g RPV. Nejvyšší množství obsahovaly pšeničné otruby, nejméně vaječné těstoviny.

Obsah redukujících sacharidů se u vzorků rýže pohyboval od 289,19 mg/100 g RPV do 509,25 mg/100 g RPV. Výjimky tvořila Lagris, rýže dlouhozrná PARBOILED s obsahem redukujících sacharidů 1564,58 mg/100 g RPV, Menu zlaté PARBOILED s obsahem 1930,47 mg/100 g RPV a rýže Natural BIO s obsahem redukujících sacharidů 2120,90 mg/100 g RPV. První dvě zmiňované rýže byly podrobeny hydrotermické úpravě. Jejich vysoký obsah redukujících sacharidů může být příčinou této úpravy. Rýže Natural BIO, jedná se o rýži neloupanou, obsahuje nejvýše redukujících sacharidů. Toto vysoké množství může být způsobeno přítomnými sacharidy v obalových vrstvách. Podíl redukujících sacharidů z celkových byl 5,50 - 27,28 %. Nejmenší podíl obsahovala rýže Natural BIO. V obalových vrstvách převládají složitější sacharidy nad redukujícími, proto při podílu redukujících sacharidů z celkových dochází k nízkým hodnotám. Nejvyšší podíl obsahovala

rýže Long grain white rice ve varných sáčcích. Obsah redukujících sacharidů se u ostatních substrátů pohyboval v rozmezí 1,61 - 13,79 g/100 g rozpustného podílu výrobku. Nejvíce redukujících sacharidů obsahovala jablečná vláknina, nejméně redukujících sacharidů obsahovaly vaječné nudle s obsahem 1,61 g/100 g RPV a vaječné těstoviny s obsahem 2,17 g/100 g RPV. Hodnota redukujících sacharidů naznačuje využitelný podíl z celkových sacharidů, který je u většiny druhů rýže kolem 20%. Pokud srovnáme rýžový substrát s ostatními materiály, pšeničné otruby jsou srovnatelné s rýží a u jablečné vlákniny je více než 50%.

Vybrané druhy rýže byly dále podrobeny kyselé hydrolýze a poté byl změřen obsah redukujících sacharidů. Rozsah redukujících sacharidů byl 46,34 - 71,89 g/100 g výrobku. Nejnižší obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze obsahovala neloupaná rýže Natural BIO, nejvíce rýže Long grain white rice. Rýže Menu zlaté obsahovala 60,52 g/100 g výrobku, rýže Menu zlaté Parboiled 69,72 g/100 g výrobku. Pokud posoudíme obsah redukujících sacharidů posledních dvou zmiňovaných rýží, hydrotermická úprava mohla mít vliv na jejich zvýšený obsah. V porovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků rýže ve vodě se vzorky po kyselé hydrolýze byl zjištěn rozdíl o tři řády. Kyselé hydrolýza působící na vzorky rýže byla velmi účinná. Rozsah redukujících sacharidů u ostatních substrátů byl v rozmezí od 23,15 do 74,23 g/100 g výrobku. Nejvyšší obsah redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze ostatních substrátů byl u vaječných nudlí, velmi vysoký obsah měly vaječné těstoviny a to 71,62 g/100 g výrobku. Nejmenší obsah byl u pšeničných otrub. Při srovnání redukujících sacharidů při extrakci vzorků ostatních substrátů ve vodě s ostatními substráty po kyselé hydrolýze byl zjištěn rozdíl menší než u srovnání redukujících sacharidů u vzorků rýže. U ostatních substrátů byl rozdíl redukujících sacharidů o jeden řád.

Pomocí metody HPLC/RI byl sledován obsah mono- a disacharidů ve vzorcích rýže a u ostatních substrátů. Ve vzorcích rýže byla detekována arabinosa, glukosa, sacharosa, maltosa a cellobiosa. Největší množství arabinosy bylo naměřeno u rýže Natural BIO a to 53,92 mg/100 g substrátu a rýže Albert Bio měla obsah 45,49 mg/100 g substrátu. Největší množství glukosy bylo naměřeno opět u neloupané rýže Natural BIO s obsahem 252,40 mg/100 g substrátu a u rýže Albert Bio s obsahem 174,64 mg/100 g substrátu. Vysoké množství sacharosy bylo naměřeno ve všech vzorcích rýže. Největší množství bylo detekováno u neloupané rýže Natural Bio s obsahem 284,93 mg/100 g substrátu, u rýže Albert Bio byl obsah velmi podobný a to 266,38 mg/100 g substrátu. Nejvyšší obsah maltosy byl naměřen opět u neloupané rýže Natural BIO s obsahem 472,67 mg/100 g substrátu. Cellobiosa byla detekována pouze ve dvou vzorcích rýže z šesti měřených, u rýže Natural BIO a rýže Albert Bio. U ostatních substrátů byla detekována arabinosa, fruktosa, glukosa, sacharosa, maltosa a cellobiosa. U pšeničných otrub a vaječné vlákniny bylo naměřeno výrazně vyšší množství arabinosy, fruktosy, glukosy, sacharosy a cellobiosy oproti vaječným nudlím a vaječným těstovinám.

Modelové průmyslové mikroorganismy - kvasinka *Rhodotorula glutinis* a bakterie *Bacillus subtilis* byly kultivovány na médiích, ve kterých byla jako substrát obsažena loupaná nebo neloupaná rýže, která byla před kultivací extrahována ve vodě nebo podrobena kyselé nebo enzymové hydrolýze. Jako kontrola byla použita glukosa. Po těchto úpravách a sterilaci byl zjištěn obsah redukujících sacharidů. U médií, kde byl substrát extrahován ve vodě, byl obsah výrazně nižší, než u médií, kde byl substrát podroben kyselé nebo enzymové hydrolýze.

Z naměřených výsledků vyplývá, že nejlepší rozklad složitějších sacharidů byl proveden enzymovou hydrolýzou. Po 80 hodinách kultivace *R. glutinis* došlo k výraznému poklesu obsahu redukujících sacharidů v médiích. Největší pokles byl zaznamenán u média, kde jako substrát byla použita glukosa. Druhý největší pokles byl zaznamenán u enzymové hydrolýzy, menší pokles u kyselé hydrolýzy a nejmenší pokles byl naměřen u médií, kde byl substrát extrahován ve vodě. U enzymové a kyselé hydrolýzy došlo k rozkladu složitých sacharidů a tím k většímu množství redukujících sacharidů, které jsou pro kvasinku jako substrát velmi příznivé. U médiích, kde byl substrát extrahován ve vodě, byly nuceny kvasinky použít jako substrát veškerý možný zdroj uhlíku, proto došlo k malé změně redukujících sacharidů. Nejvyšší obsah biomasy byl sledován u enzymové hydrolýzy. Tento zvýšený obsah mohl být způsoben pozitivními stresy působícími na kvasinku v produkčních médiích. V produkčních médiích u enzymové hydrolýzy mohou být tedy látky pozitivně ovlivňující růst kvasinky *R. glutinis*. U produkčních médií, které byly podrobeny kyselé hydrolýze, byl obsah biomasy nižší než u kontroly. Nejméně biomasa obsahovala produkční média, kde byl substrát extrahován ve vodě. U kyselé hydrolýzy mohly být stresovými faktory chemikálie, které byly použity na kyselou hydrolýzu.

Po 30 hodinách kultivace bakterií *Bacillus subtilis* došlo k velkému úbytku redukujících sacharidů podobně jako u kvasinky *R. glutinis*. U médií, kde byl substrát extrahován ve vodě, došlo k mírnému nárůstu redukujících sacharidů. Tento nárůst mohl být způsoben extracelulárními amylolytickými enzymy, které produkuje *B. subtilis*. Největší úbytek redukujících sacharidů byl zaznamenán u kontroly-glukosy. Velký úbytek byl naměřen u enzymové hydrolýzy, menší u kyselé hydrolýzy. U kyselé hydrolýzy mohl být menší úbytek a tím i menší růst bakterie způsoben chemikáliemi použitými na kyselou hydrolýzu. Největší nárůst biomasy byl pozorován u substrátů, které byly extrahovány ve vodě. U substrátů podrobených kyselé hydrolýze byl nárůst větší, než nárůst biomasy u kontroly-glukosy. Nejmenší množství biomasy bylo naměřeno u substrátů, které byly podrobeny enzymové hydrolýze. Vliv na růst v produkčních médiích mohl mít osmotický tlak. U enzymové hydrolýzy byl nárůst biomasy nižší, protože sacharidy zvyšují osmotický tlak v médiu, což může být projevem malého nárůstu biomasy. Dalším problémem mohl být samotný zákal médií. Po enzymové hydrolýze bylo médium čířejší díky rozkladu rýže pomocí enzymů a tím i tedy menší absorbance. Po kyselé hydrolýze byl roztok zbarvený oranžovo-hnědě. Díky tomu mohla být absorbance zkreslena a ve výsledku vychází vyšší naměřené množství biomasy. U médií, které byly extrahovány ve vodě, byla barva tmavší, než po enzymatické hydrolýze. I toto mohlo způsobit vyšší absorbanci a tím větší naměřené množství biomasy. U obou kmenů je třeba brát do úvahy i širší metabolické souvislosti a regulační mechanismy, jejichž diskuse přesahuje rámec předložené práce.

Závěrem lze konstatovat, že různé druhy rýže s výjimkou speciálních technologicky zpracovaných typů (parboiled) a divoké rýže obsahují velmi podobný obsah sacharidů a podobně se chovají i v průběhu chemických a enzymových úprav. Rýže ve formě vodního extraktu je vhodným komplexním substrátem pro kultivaci bakterie *B. subtilis*, zatímco kvasinka *R. glutinis* preferuje využití enzymově hydrolyzované rýže. Rýži (odpad) lze považovat za výhodnou sekundární surovinu pro biotechnologické účely.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Marek, M., Voldřich, M.: *Odpady z potravinářských výrob v životním prostředí*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2006. 15 s. [online]. [cit. 2011-04-19]. Dostupné z www: http://www.phytopsanitary.org/projekty/2005/VVF_07_2005.pdf
- [2] Filip, J., a kol.: *Odpadové hospodářství*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002. 118 s. ISBN 80-7157-608-5.
- [3] Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R.: Microbial pectinolytic enzymes: *Process Biochemistry*, [online], 2005, [cit. 2011-03-29], vol. 40, no. 9, pp. 2931-2944.
- [4] Jirásková, I., Sobotka, M.: *Zákon o odpadech s vysvětlivkami a prováděcí předpisy*. 2. vyd. Praha: Linde, 2005. ISBN 80-7201-317-3.
- [5] Kuraš, M.: *Odpadové hospodářství*. 1. vyd. Chrudim: Ekomonitor, 2008. 143s. ISBN 978-80-86832-34-0.
- [6] Voštová, V.: *Logistika odpadového hospodářství*. 1. vyd. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2009. 349 s. ISBN 978-80-01-04426-1.
- [7] Velíšek, J., Hajšlová J.: *Chemie potravin 1*. 3. rozš. a přeprac. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 602 s. ISBN 978-808-6659-17-6.
- [8] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. upr. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [9] Čopíková, J.: *Chemie a analytika sacharidů*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 1997. 104 s. ISBN 80-708-0306-1.
- [10] α -D-glucopyranose [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.71358.html>
- [11] β -D-Fructofuranose [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.388775.html>
- [12] Sucrose [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=166e8bc7-574a-4a06-95eb-9fab270e4d80>
- [13] Maltose [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=25c4223e-6079-4ae0-b6ae-3203af2d1295>
- [14] Lactose [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=b8ec35ee-0dc9-4225-a0ed-2c79d4906ce7>
- [15] Amylopectin from potato starch [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A8515|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPECi
- [16] Amylase from potato [online]. [cit. 2011-03-21]. Dostupné z www: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A0512|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC
- [17] Kadlec, P.: *Technologie sacharidů*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2000. 138 s. ISBN 80-708-0400-9.
- [18] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková M.: *Cereální chemie a technologie 1: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003. 202 s. ISBN 80-708-0530-7.
- [19] Čepička, J., a kol.: *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.

- [20] Kopáčová, O.: *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007. 56 s. ISBN 978-80-7271-184-0. [online]. [cit. 2011-03-22]. Dostupné z www: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kopov_Cerelie%20web.pdf
- [21] Benda, V., Babůrek, I., Žďárský, J.: *Biologie II, Nauka o potravinářských surovinách*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2000. 195 s. [online]. [cit. 2011-03-22]. Dostupné z www: <http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/baburek/BII.pdf>
- [22] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J.: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia Praha, 2008. ISBN 80-200-0586-2
- [23] Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass: *Bioresource technology*, [online], 2009, [cit. 2011-03-29], vol. 100, no. 1, pp. 10-18.
- [24] Sanchéz, C.: Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi: *Biotechnology Advances*, [online], 2009, [cit. 2011-03-29], vol. 27, no. 2, pp. 185-194.
- [25] Sun, A., Cheng, J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: *Bioresource Technology*, [online], 2002, [cit. 2011-03-29], vol. 83, no. 1, pp. 1-11.
- [26] Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G., Faaij, A.: Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term: *Biomass and Bioenergy*, [online], 2005, [cit. 2011-03-29], vol. 28, pp. 384-410.
- [27] Mužík, O., Kára, J.: *Možnosti výroby a využití bioplynu v ČR*, [online], 2009, [cit. 2011-03-29], Dostupné z www: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/moznost-vyroby-a-vyuziti-bioplynu-v-cr>
- [28] Malisorn, C., Suntornsuk, W.: Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine: *Bioresource Technology*, [online], 2008, [cit. 2011-04-06], vol. 99, no. 7, pp. 2281-2287.
- [29] Aksu, Z., Eren, A.T.: Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*: *Biochemical Engineering Journal*, [online], 2007, [cit. 2011-04-06], vol. 35, no. 2, pp. 107-113.
- [30] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [31] Amyloglucosidase [online]. [cit. 2011-04-10]. Dostupné z www: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/MATERIALS/ENZYMES/amg.html>
- [32] Novozymes A/S [online]. [cit. 2011-04-10]. Dostupné z www: http://www.gramatrading.ro/opencms/export/gramatrading/partners/novozymes/industria_berii/index.html
- [33] González-Rodríguez, J., Pérez-Juan, P., Luque de Castro, M. D.: Method for the simultaneous determination of total polyphenol and anthocyan indexes in red wines using a flow injection approach: *Talanta*, [online], 2002, [cit. 2011-03-23], vol. 56, no. 1, pp. 53-59.
- [34] Ming-Yen, J., Cheng-Chun, Ch.: Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715: *Food Microbiology*, [online], 2010, [cit. 2011-03-23], vol. 27, no. 5, pp. 586-591.
- [35] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

- [36] Deng, S. P., Tabatabai, M. A.: Colorimetric determination of reducing sugars in soils: *Biology and Biochemistry*, [online], 1994, [cit. 2011-04-21], vol. 26, no. 4, pp. 473-477.
- [37] Valentová, R.: *Analýza vybraných aktivních látek v různých druzích výrobků z rýže*. Brno: Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [38] Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutagenese, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000. ISBN 80-902-5622-8.
- [39] Kostovová, I.: *Možnosti využití odpadních lipidů a glycerolu k produkci karotenoidů kvasinkami*. Brno: Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [40] Sedláček, I.: *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [41] Pala, M.: *Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy*. Brno: Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RI	Refractometric Identification
RPV	rozpustný podíl výrobku
KH	kyselá hydrolýza
EH	enzymová hydrolýza
EV	extrakce ve vodě
<i>RG</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>BC</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
FC	Folin-Ciocalteuovo činidlo
AMG	amyloglukosidasa
INO I	inokulum I
INO II	inokulum II
RS	redukující sacharidy
CS	celkové sacharidy
nd	non detected
TLC	Thin Layer Chromatography

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení redukujících sacharidů

Příloha 2 – Chromatogram mono- a disacharidů u neloupané rýže po extrakci ve vodě

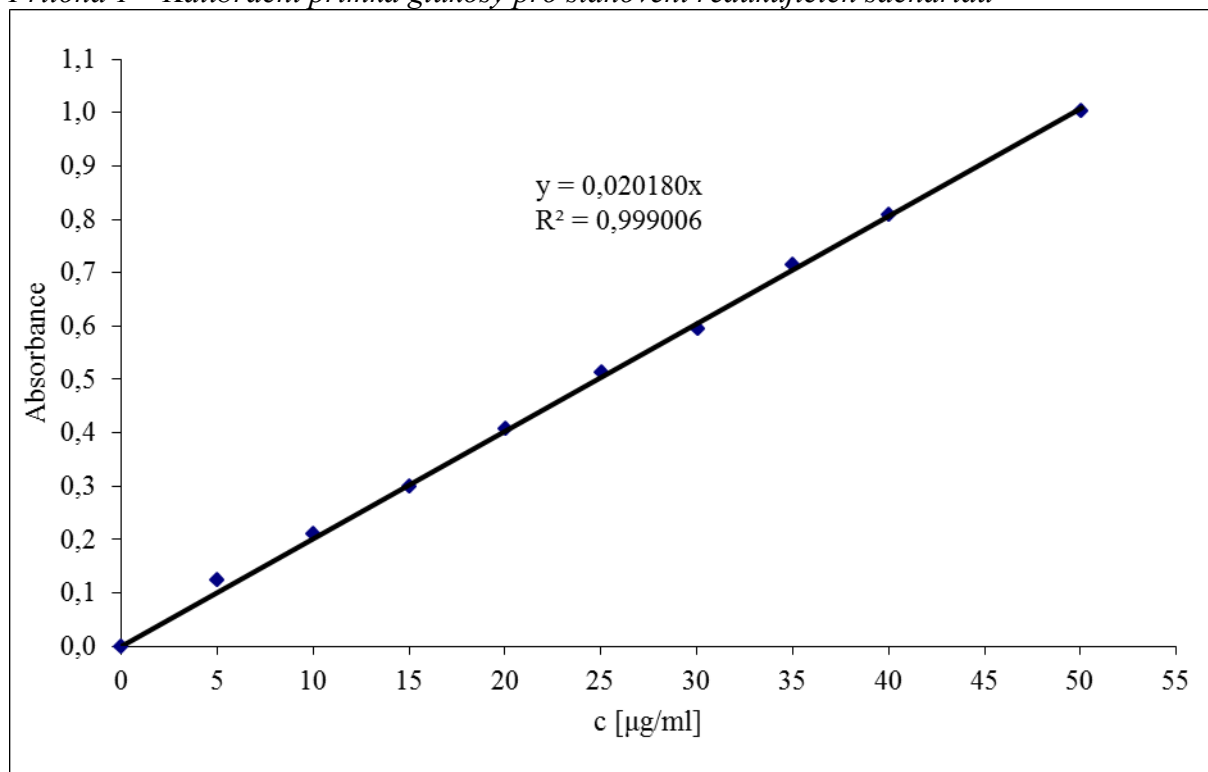
Příloha 3 – Chromatogram mono- a disacharidů u jablečné vlákniny po extrakci ve vodě

Příloha 4 – Chromatogram mono- a disacharidů u pšeničných otrub po extrakci ve vodě

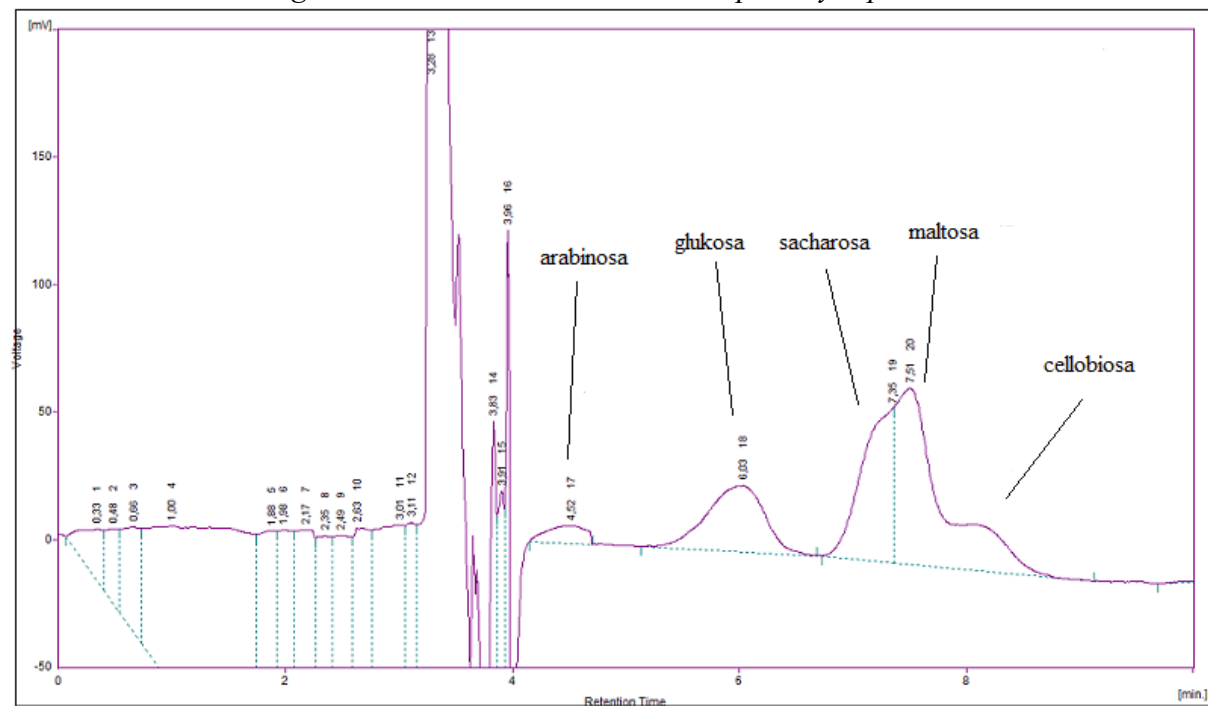
Příloha 5 – Tenkovrstvá chromatografie různých sacharidů se vzorkem neloupané rýže

10 PŘÍLOHY

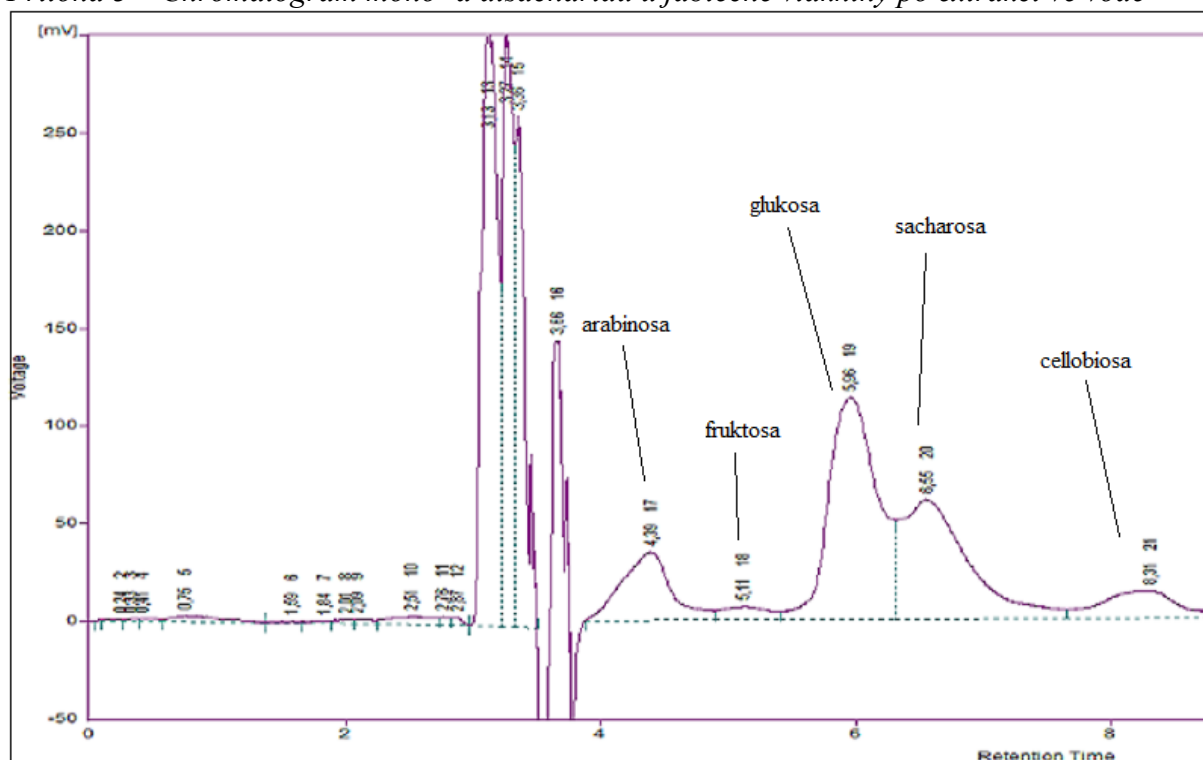
Příloha 1 – Kalibrační přímka glukosy pro stanovení redukujících sacharidů



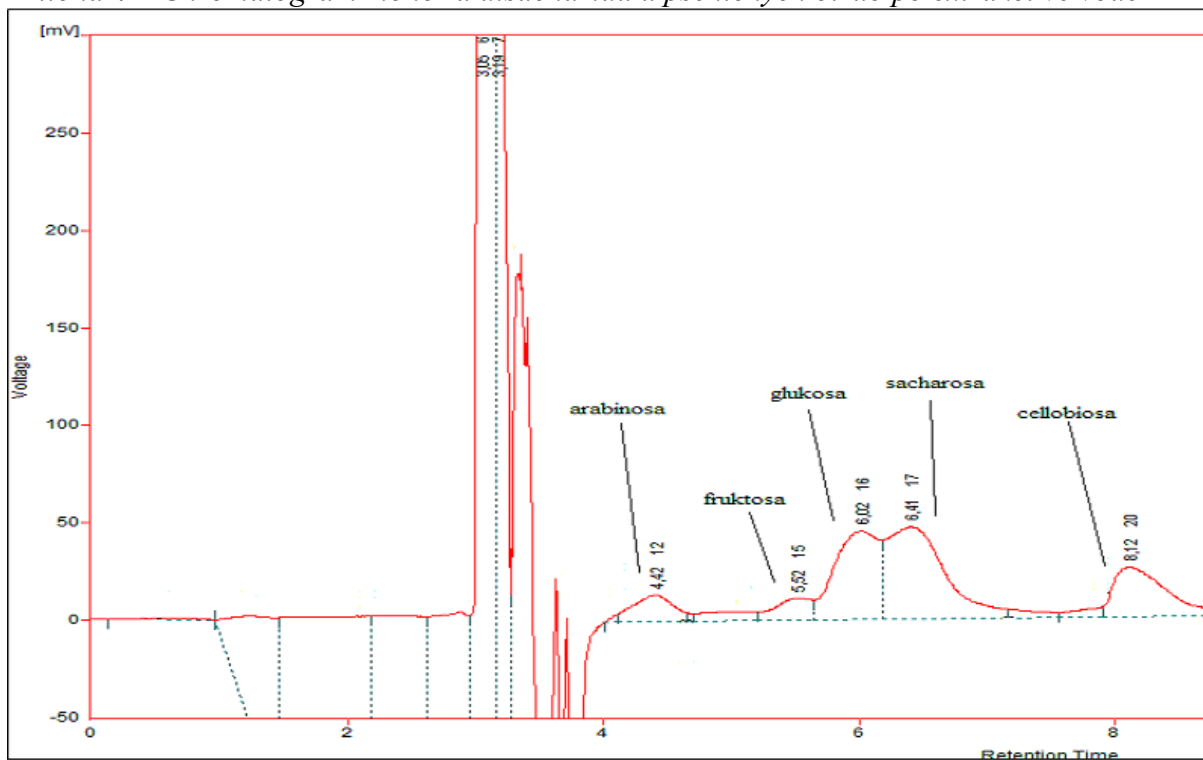
Příloha 2 – Chromatogram mono- a disacharidů u neloupané rýže po extrakci ve vodě



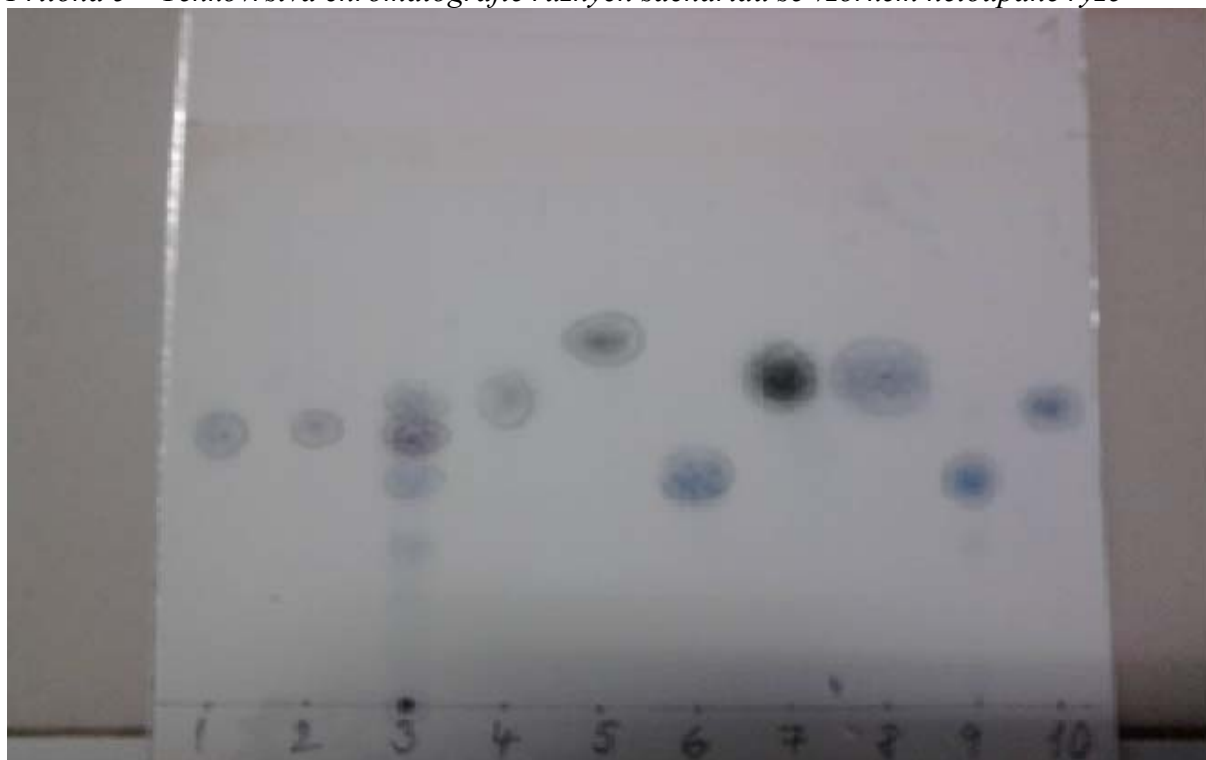
Příloha 3 – Chromatogram mono- a disacharidů u jablečné vlákniny po extrakci ve vodě



Příloha 4 – Chromatogram mono- a disacharidů u pšeničných otrub po extrakci ve vodě



Příloha 5 – Tenkovrstvá chromatografie různých sacharidů se vzorkem neloupané rýže



1 – galaktosa, 2 – sacharosa, 3 – vzorek, 4 – arabinosa, 5 – xylosa, 6 – cellobiosa, 7 – ribosa, 8 – mannosa, 9 – maltosa, 10 – glukosa